VISIT…

LANZAROTE Caliente.com

С. Н. ЩЕЛКУНОВ

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

СИБИРСКОЕ УНИВЕРСИТЕТСКОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО

С. Н. ЩЕЛКУНОВ

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

2-е издание, исправленное и дополненное

Рекомендовано Министерством образования Российской Федерации в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению «Биология» и специальностям «Биотехнология», «Биохимия», «Генетика», «Микробиология»

СИБИРСКОЕ УНИВЕРСИТЕТСКОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО
НОВОСИБИРСК • 2004

УДК 575/578
ББК Е041.15
Щ45

РФФИ

Издание осуществлено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (издательский проект № 03-04-62013)

Рекомендовано к печати
Ученым советом Новосибирского государственного университета

Рецензенты:

Кафедра молекулярной биологии Новосибирского государственного университета, академик РАН, профессор *В. В. Власов*

Кафедра генетики и селекции Санкт-Петербургского государственного университета, академик РАН, профессор *С. Г. Инге-Вечтомов*

Директор Института молекулярной генетики РАН, академик РАН, профессор *Е. Д. Свердлов*

Ректор Пущинского государственного университета, чл.-корр. РАН, профессор *А. М. Боронин*

Заведующий кафедрой физиологии растений и клеточной биологии Иркутского государственного университета, чл.-корр. РАН, профессор *Р. К. Саляев*

Щелкунов С. Н.
Щ45 Генетическая инженерия: Учеб.-справ. пособие. — 2-е изд., испр. и доп. — Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. — 496 с.; ил.
ISBN 5-94087-098-8

Первое отечественное учебно-справочное пособие, в котором подробно и доходчиво рассмотрены основные понятия и методы генетической инженерии. В книге на большом числе примеров дан критический анализ подходов к клонированию и экспрессии чужеродных генов в клетках грамотрицательных и грамположительных бактерий, дрожжах и клетках высших эукариот. Пособие подготовлено на основе лекций, читаемых автором в Новосибирском государственном университете с 1980 г.

В новое издание введены главы, посвященные трансгенным животным и растениям, современным подходам к созданию эффективных противовирусных вакцин, значительно дополнены разделы по белковой инженерии, расшифровке нуклеотидных последовательностей ДНК, использованию полимеразной цепной реакции в фундаментальных и прикладных исследованиях.

Большое число рисунков и таблиц значительно облегчают понимание весьма сложного материала. В каждой главе приведен список литературы.

Издание рассчитано на студентов, аспирантов и преподавателей биологических и химических факультетов вузов, а также научных сотрудников, работающих в области молекулярной биологии, генетики, биохимии, микробиологии и биотехнологии.

УДК 575/578
ББК Е041.15

ISBN 5-94087-098-8

© Щелкунов С. Н., 2004
© Сибирское университетское издательство, 2004

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие 7

Глава 1. **Общие принципы и методы генетической инженерии** 9

1.1. Строение и свойства молекулы ДНК. 10

1.2. Ферменты генетической инженерии 12

1.2.1. Рестриктазы 13

1.2.2. ДНК-лигаза. 22

1.2.3. ДНК-полимераза I *E. coli* 23

1.2.4. Обратная транскриптаза 25

1.2.5. Нуклеаза Bal31. 27

1.2.6. Концевая дезоксинуклеотидил-трансфераза 27

1.2.7. Поли(А)-полимераза *E. coli*. 28

1.3. Методы конструирования гибридных молекул ДНК *in vitro* 28

1.3.1. Коннекторный метод 28

1.3.2. Рестриктазно-лигазный метод 29

1.4. Векторные молекулы ДНК 31

1.5. Введение молекул ДНК в клетки 32

1.6. Методы отбора гибридных клонов 34

1.6.1. Фенотипическая селекция 34

1.6.2. Гибридизация нуклеиновых кислот *in situ* 34

1.6.3. Функциональная комплементация 35

1.6.4. Радиоиммуноанализ белков *in situ* 35

1.7. Расшифровка нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК. . . . 36

1.7.1. «Плюс-минус»-метод 36

1.7.2. Метод Сэнгера 38

1.7.3. Метод Максама–Гилберта 38

1.7.4. Автоматическое секвенирование ДНК. . 42

1.7.5. Базы данных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей. 44

1.7.6. Геномные проекты. 45

1.8. Амплификация последовательностей ДНК *in vitro*. 48

1.8.1. Полимеразная цепная реакция 48

1.8.2. Примеры использования ПЦР 51

1.9. Блоттинг по Саузерну 56

1.10. Иммуноблоттинг 57

1.11. Разделение электрофорезом гигантских молекул ДНК 58

1.12. Методы химико-ферментативного синтеза двухцепочечных фрагментов ДНК (*А. Н. Синяков*) 59

1.12.1. Метод Кораны 59

1.12.2. Конструирование ДНК-дуплексов из частично комплементарных полинуклеотидов 72

1.12.3. Конструирование искусственных генов из сверхдлинных полинуклеотидов . . 74

1.12.4. Использование для синтеза генов полимеразной цепной реакции 75

Глава 2. **Векторная система грамотрицательной бактерии *Escherichia coli*** 80

2.1. Введение плазмидных и фаговых молекул ДНК в клетки *E. coli*. 80

2.1.1. Строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий. 80

2.1.2. Сферопласты 83

2.1.3. «Кальциевые» компетентные клетки. . . 83

2.1.4. Электропорация 84

2.1.5. Упаковка ДНК фага лямбда в капсиды *in vitro*. 84

2.2. Молекулярные векторы *E. coli* 85

2.2.1. Клонирующие плазмидные векторы . . . 85

2.2.2. Молекулярные векторы на основе ДНК фага лямбда 97

2.2.3. Космиды. 105

2.2.4. Искусственные бактериальные хромосомы 107

2.2.5. Фазмиды 109

2.2.6. Клонирующие векторы на основе нитевидных фагов 110

2.2.7. Фагмиды. 118

2.2.8. Векторные плазмиды, обеспечивающие прямой отбор гибридных ДНК 118

2.2.9. Векторы, обеспечивающие экспрессию чужеродных генов в клетках *E. coli*. . . 121

2.2.10. Векторы *E. coli*, детерминирующие секрецию чужеродных белков 130

Глава 3. **Достижение повышенной продукции белков, кодируемых генами, клонированными в клетках *Escherichia coli*** 139

3.1. Эффект дозы гена при молекулярном клонировании 139

3.2. Влияние эффективности транскрипции клонированных генов на уровень их экспрессии 142

3.3. Повышение эффективности трансляции матричных РНК 148

3.4. Стабилизация чужеродных мРНК и белков в клетках *E. coli* 152

Глава 4. **Экспрессия клонированных эукариотических генов в клетках *Escherichia coli*** 157

4.1. Сравнительный анализ организации и реализации генетической информации у прокариот и эукариот 157

4.2. Экспрессия хромосомных эукариотических генов в клетках *E. coli* 158

4.3. Клонирование ДНК-копий эукариотических матричных РНК и их экспрессия в клетках *E. coli* 161

4.4. Экспрессия в *E. coli* химико-ферментативно синтезированных ген-эквивалентов эукариотических полипептидов 163

Глава 5. **Конструирование штаммов — продуцентов первичных метаболитов на основе *Escherichia coli*** 167

Глава 6. **Направленный мутагенез молекул ДНК *in vitro*** 171

6.1. Генно-инженерные делеции и вставки последовательностей ДНК. 172

6.2. Статистический мутагенез гибридных ДНК 173

6.3. Сегмент-направленный мутагенез *in vitro* 175

6.4. Олигонуклеотид-направленный мутагенез *in vitro* 180

Глава 7. **Белковая инженерия**. 187

7.1. Получение новых форм белков олигонуклеотид-направленным мутагенезом 187

7.2. Изучение доменной структуры белков . . . 190

7.3. Создание белков с гибридными свойствами 191

7.4. Иммунотоксины 195

7.5. Фаговый дисплей 196

7.5.1. Принцип метода 196

7.5.2. Пептидные фаговые библиотеки 198

7.5.3. Фаговый дисплей белков 199

7.5.4. Направленная эволюция белков. 200

7.5.5. Фаговый дисплей антител 200

Глава 8. **Стабильность гибридных молекул ДНК в клетках *Escherichia coli*** 204

Глава 9. **Векторные системы грамотрицательных бактерий, не относящихся к роду *Escherichia*** 211

9.1. Плазмиды широкого круга хозяев. 211

9.2. Молекулярные векторы на основе плазмид группы несовместимости IncQ 216

9.3. Молекулярные векторы на основе плазмид группы несовместимости IncP 225

9.4. Использование векторов широкого круга хозяев для молекулярно-генетических исследований грамотрицательных бактерий. 228

9.5. Бифункциональные (челночные) векторные плазмиды 229

Глава 10. **Генно-инженерная система грамположительных бактерий рода *Bacillus*** 233

10.1. Введение молекул ДНК в клетки *Bacillus* 234

10.1.1. Строение клеточной стенки грамположительных бактерий 234

10.1.2. Трансформация компетентных клеток 234

10.1.3. Универсальные методы введения плазмид 238

10.1.4. Трансфекция. 239

10.2. Молекулярные векторы *Bacillus* 240

10.2.1. Клонирующие векторы на основе плазмид стафилококков и стрептококков 240

10.2.2. Векторы на основе плазмид *Bacillus* . 246

10.2.3. Векторные плазмиды, реплицирующиеся в *B. subtilis* и в *E. coli* 249

10.2.4. Векторная система секреции чужеродных белков из клеток *Bacillus* 250

10.2.5. Плазмидные интегративные векторы . 257

10.2.6. Фаговые векторы 260

10.3. Экспрессия чужеродных генов в клетках *Bacillus* 262

10.3.1. Особенности строения и экспрессии генов грамположительных бактерий 262

10.3.2. Оптимизация экспрессии клонированных генов. 265

10.4. Стабильность плазмид в клетках *B. subtilis* 267

Глава 11. **Генно-инженерные системы грамположительных бактерий, не относящихся к роду *Bacillus*** 271

11.1. Бактерии рода *Streptococcus* 271

11.2. Бактерии рода *Streptomyces*. 275

11.3. Коринеформные бактерии 280

Некоторые проблемы, возникающие при синтезе в бактериях эукариотических белков 283

Глава 12. **Генно-инженерная система дрожжей *Saccharomyces cerevisiae***. 286

12.1. Генетическая организация дрожжей-сахаромицетов 286

12.2. Плазмиды *S. cerevisiae* 289

12.3. Плазмидная трансформация клеток дрожжей 292

12.4. Молекулярные векторы *S. cerevisiae*. . . . 294
12.4.1. Векторы интеграции 294
12.4.2. Клонирующие векторы. 298
12.4.3. Стабильные молекулярные векторы. . 301
12.4.4. Линейные молекулярные векторы. . . 305

12.5. Клонирование генов в клетках *S. cerevisiae* 310
12.5.1. Экспрессирующие векторные системы *S. cerevisiae* 310
12.5.2. Секреция чужеродных белков из клеток *S. cerevisiae* 318
12.5.3. Продукция чужеродных белков в *S. cetevisiae*. 322
12.5.4. Двухгибридная система дрожжей для идентификации белок-белковых взаимодействий 326

Глава 13. **Генетическая инженерия культивируемых клеток млекопитающих**. 332

13.1. Введение молекул ДНК в клетки млекопитающих. 332
13.1.1. Введение вирусных ДНК. 332
13.1.2. Введение плазмид и фрагментов ДНК 335

13.2. Стабильность гибридных молекул ДНК в культивируемых клетках млекопитающих. 338

13.3. Генетическая трансформация клеток млекопитающих. 339
13.3.1. Генетическая трансформация мутантных линий 339
13.3.2. Котрансформация. 342
13.3.3. Доминантные амплифицируемые маркеры генетической трансформации 343
13.3.4. Эписомные векторы генетической трансформации 348
13.3.5 Регулируемая экспрессия целевых генов 349

Глава 14. **Векторные системы на основе вирусов животных**. 354

14.1. Вирус SV40 как молекулярный вектор . . 354
14.1.1. Структурно-функциональная организация генома SV40 354
14.1.2. Литические векторы на основе ДНК вируса SV40 358
14.1.3. Нелитические эписомные векторы на основе генетических элементов SV40 363
14.1.4. Трансформирующие векторы на основе SV40 364
14.1.5. Особенности экспрессии клонированных последовательностей в составе генома SV40 365

14.2. Молекулярные векторы на основе генома вируса папилломы быка 366

14.3. Аденовирусы в качестве молекулярных векторов. 371
14.3.1. Молекулярно-генетическая организация Ad2 и Ad5 человека . . . 371
14.3.2. Конструирование гибридных аденовирусов 375
14.3.3. Рекомбинантные аденовирусные вакцины 381
14.3.4. Генная терапия 382

14.4. Молекулярные векторы на основе вирусов семейства Herpesviridae. 384
14.4.1. Конструирование *in vivo* гибридных вирусов простого герпеса 386
14.4.2. Разработка живых вакцин на основе герпесвирусов животных. 387
14.4.3. HSV-ампликоны. 388
14.4.4. Плазмидные векторы на основе элементов генома вируса Эпштейна–Барр. 389

14.5. Экспрессирующие векторы на основе поксвирусов 390
14.5.1. Структура вириона и генома ортопоксвирусов 390
14.5.2. Конструирование гибридных вирусов осповакцины. 392
14.5.3. Использование гибридных поксвирусов для вакцинации домашних и диких животных 400

14.6. Трансдукция генов с помощью ретровирусов 400
14.6.1. Молекулярно-генетическая организация ретровирусов 400
14.6.2. Ретровирусные молекулярные векторы 402
14.6.3. Генетическая нестабильность гибридных ретровирусов. 408
14.6.4. Ретровирусы в качестве инструмента генной терапии 409

Глава 15. **Вирусы насекомых как векторы высокоэффективной экспрессии чужеродных генов** . . . 415
15.1. Молекулярно-генетическая организация бакуловирусов . . . 415
15.2. Клонирование и экспрессия чужеродных генов в составе генома бакуловирусов . . 417
15.3. Упрощенная система создания гибридных бакуловирусов Bac-to-Bac . . . 426

Глава 16. **Векторная система на основе транспозонов эукариот** . . . 429

Глава 17. **Противовирусные вакцины** . . . 432
17.1. Цельновирионные вакцины . . . 434
17.2. Вакцины на основе вирусных антигенов . . . 434
17.3. Генно-инженерные поливалентные живые вакцины . . . 437
17.4. ДНК-вакцины . . . 438
17.5. Вакцины против вируса иммунодефицита человека . . . 439
17.5.1. Пандемия СПИДа . . . 439
17.5.2. Тестирование HIV-инфекции . . . 441
17.5.3. Стадии развития HIV-инфекции . . . 441
17.5.4. Варианты вакцин против вируса иммунодефицита человека . . . 442

Глава 18. **Трансгенные животные** . . . 448
18.1. Получение трансгенных животных . . . 448
18.1.1. Клетки тератокарциномы мыши . . . 448
18.1.2. Микроинъекция ооцитов . . . 449
18.1.3. Эмбриональные стволовые клетки . . 450
18.1.4. Ретровирусы . . . 450
18.2. Экспрессия генов в трансгенных мышах . 451
18.3. Трансгенные животные в фундаментальных исследованиях . . . 453
18.3.1. Нокаутные мыши . . . 453
18.3.2. Регулируемое включение–выключение генов *in vivo* . . . 454
18.4. Биотехнологическое применение трансгенных животных . . . 457

Глава 19. **Трансгенные растения** . . . 460
19.1. Перенос генов в растения из бактерий рода *Agrobacterium* . . . 460
19.2. Использование плазмид Ti *A. tumefaciens* для создания трансгенных растений . . . 463
19.3. Получение трансгенных растений с помощью бинарной векторной системы *A. tumefaciens* . . . 464
19.4. Экспрессия и наследование чужеродных генов, введенных в растения в составе Т-ДНК . . . 466
19.5. Прямой метод введения трансгена в растения . . . 467
19.6. Синтез в растениях чужеродных белков медицинского назначения . . . 468
19.6.1. Терапевтические и диагностические антитела . . . 468
19.6.2. Съедобные вакцины . . . 471
19.7. Перенос генов в растения с помощью вирусов . . . 475
19.8. Трансгенная система хлоропластов . . . 479
19.9. Белковый сплайсинг в трансгенных растениях . . . 483
19.10. Удаление маркерных генов из трансгенных растений . . . 485
19.11 Трансгенные растения с новыми биотехнологическими свойствами . . . 485
19.12. Трансгенные растения в сельском хозяйстве . . . 488

Предметный указатель . . . 491

ПРЕДИСЛОВИЕ

Генетическая инженерия представляет собой удивительное явление в науке, когда разработка новой методологии дает мощный импульс развитию нашего понимания окружающей природы, ее сокровенных глубин. Бурному прогрессу генетической инженерии способствовало то, что уже в начале 1970-х гг., сразу после первых, еще робких экспериментов по рекомбинации *in vitro* негомологичных молекул ДНК, научной общественностью была осознана огромная важность и перспективность данной методологии. Это привлекло к ней широкие круги биохимиков, биологов, химиков и исследователей ряда других специальностей. Генно-инженерные эксперименты, выполненные в лабораториях разных стран, привели к такому фейерверку открытий, какого биологическая наука до тех пор не знала. В огромном потоке публикаций по генетической инженерии регулярно появляются работы, восхищающие дерзостью замысла и элегантностью методики.

Генно-инженерные исследования вносят уникальный вклад в изучение структурно-функциональной организации геномов различных организмов. Методология генетической инженерии постоянно совершенствуется, и все больше исследователей используют ее при решении самых разных задач биологической науки.

Методами генетической инженерии созданы штаммы бактерий, дрожжей, линии клеток, с высокой эффективностью продуцирующих биологически активные белки человека и животных. Это позволяет получать эукариотические полипептиды в огромных по сравнению с недавним прошлым количествах, что упрощает процедуру их очистки вплоть до индивидуального состояния. Работы по созданию штаммов-продуцентов имеют очень важное значение для медицины и ветеринарии и революционизируют бурно развивающуюся отрасль промышленности — биотехнологию. Чрезвычайно интересны исследования по созданию трансгенных животных и растений, содержащих и экспрессирующих чужеродную генетическую информацию.

Среди отечественной литературы имеется ряд обзорных материалов и монографий по различным разделам генетической инженерии. В то же время ощущается недостаток в учебной литературе, достаточно подробно и на современном уровне рассматривающей достижения, проблемы и перспективы развития данной области молекулярной биологии. В 1994 и 1997 гг. были изданы 1-я и 2-я части учебного пособия С. Н. Щелкунова «Генетическая инженерия», которое получило много положительных отзывов от научных сотрудников и преподавателей вузов. За прошедшие годы сформировались новые экспериментальные подходы, получен ряд принципиальных результатов, расширился спектр задач, решаемых методами генетической инженерии. В связи с этим возникла потребность в доработке и переиздании данного пособия.

В основу предлагаемого учебно-справочного пособия положены лекции по генетической инженерии, которые автор читает в Новосибирском государственном университете начиная с 1980 г. Ссылки на большинство экспериментальных работ, выполненных до 1986 г., читатель сможет найти в монографиях С. Н. Щелкунова «Клонирование генов» и «Конструирование гибридных молекул ДНК» (Новосибирск: Наука, 1986, 1987). Раздел 1.12 написан известным специалистом в области химико-ферментативного синтеза генов А. Н. Синяковым.

Автор книги является выпускником Новосибирского государственного университета и работает в области генетической инженерии с 1975 г. Первые генно-инженерные экспери-

менты выполнены им под руководством Н. И. Матвиенко и Л. П. Тихомировой в отделе академика А. А. Баева (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР, Пущино). С 1976 г. он и его коллеги в Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор», возглавляемом академиком Л. С. Сандахчиевым, выполнили многочисленные исследования с привлечением методов генетической инженерии на таких системах, как бактерии *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium tumifaciens*, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, культивируемые клетки млекопитающих и насекомых. В качестве молекулярных векторов использовались различные плазмиды, космиды, колифаги лямбда и M13, вирусы осповакцины и эктромелии, а также бакуловирусы. Все это позволило автору четко охарактеризовать различные генно-инженерные системы, выделить их особенности, а также обрисовать перспективы развития многих направлений исследований в современной биологической науке.

Глава 1
ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ И МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Генетическая инженерия — это новый раздел экспериментальной молекулярной биологии. Появление ее методологии стало возможным благодаря предшествующим работам многих исследователей в различных областях биохимии и молекулярной генетики. К основным достижениям, которые обусловили рождение и успешное развитие генетической инженерии, можно отнести следующие:

- доказательство в 1944 г. О. Эйвери с соавторами роли ДНК как носителя генетической информации и открытие в 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком структуры ДНК;
- экспериментальное подтверждение универсальности генетического кода;
- интенсивное развитие молекулярной генетики, объектами которой прежде всего стали бактерия *Escherichia coli*, а также ее вирусы и плазмиды;
- отработка простых методов выделения высокоочищенных препаратов неповрежденных молекул ДНК плазмид и вирусов;
- разработка методов введения в чувствительные клетки молекул ДНК вирусов и плазмид в биологически активной форме, обеспечивающей репликацию молекул ДНК и/или экспрессию кодируемых ими генов;
- открытие ряда ферментов, использующих ДНК в качестве субстрата катализируемых ими реакций, особенно рестриктаз и ДНК-лигаз.

Объединение в начале 1970-х гг. до того независимо разрабатываемых методов позволило создать современную стратегию генетической инженерии, суть которой заключается в следующем:

1) в небольшую молекулу ДНК, способную реплицироваться в клетке автономно от хромосомы (плазмиду или вирусную ДНК), ферментативно встраивают фрагменты молекул ДНК любого изучаемого организма или искусственно синтезированные сегменты ДНК;

2) образующиеся при этом молекулы (гибридные ДНК), вводят в чувствительные прокариотические или эукариотические клетки, где они реплицируются, размножая в своем составе встроенные фрагменты ДНК;

3) определенными методами отбирают клоны клеток или вирусов, содержащих индивидуальные типы молекул гибридных ДНК;

4) выявленные гибридные ДНК подвергают разностороннему структурно-функциональному изучению, особую роль при этом играют высокоэффективные методы расшифровки последовательности нуклеотидов (секвенирования) фрагментов ДНК.

Молекулы ДНК, создаваемые методами генетической инженерии, часто называют ***рекомбинантными*** ДНК (рекДНК). В данной книге конструируемые *in vitro* молекулы ДНК мы будем называть ***гибридными*** ДНК, чтобы подчеркнуть их отличие от молекул, образуемых *in vivo* в результате естественной рекомбинации природных ДНК по областям гомологии. Детерминируемые гибридными генами «составные» белки, состоящие из ковалентно связанных аминокислотных последовательностей разных белков, будем называть ***химерными***.

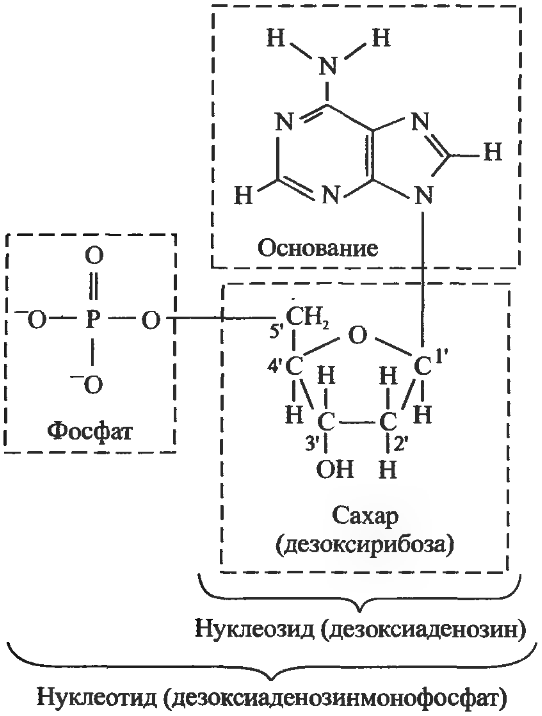
Генетическая инженерия значительно расширила экспериментальные границы молекулярной биологии, поскольку позволила вводить в различные типы клеток чужеродную ДНК и исследовать ее функционирование в гетерологичном окружении. Это дало возможность выявлять общебиологические закономерности организации и выражения генетической информации в различных организмах. Данный подход открыл перспективы создания принципиально новых микробных продуцентов биологически активных веществ, а также животных и растений, несущих функционально активные чужеродные гены. Более того, появилась возможность искусственно создавать гены, кодирующие химерные полипептиды, обладающие свойствами двух или более природных белков. Все это удивительным образом революционизировало биологическую науку и дало мощный импульс развитию биотехнологии.

1.1. СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА МОЛЕКУЛЫ ДНК

Главным объектом генно-инженерного воздействия является дезоксирибонуклеиновая кислота. Напомним закономерности строения ее молекулы.

ДНК является полимером нуклеотидов. Нуклеотид (рис. 1.1) состоит из трех компонентов: пуринового или пиримидинового основания, пятиуглеродного циклического сахара, с кото-

а



б

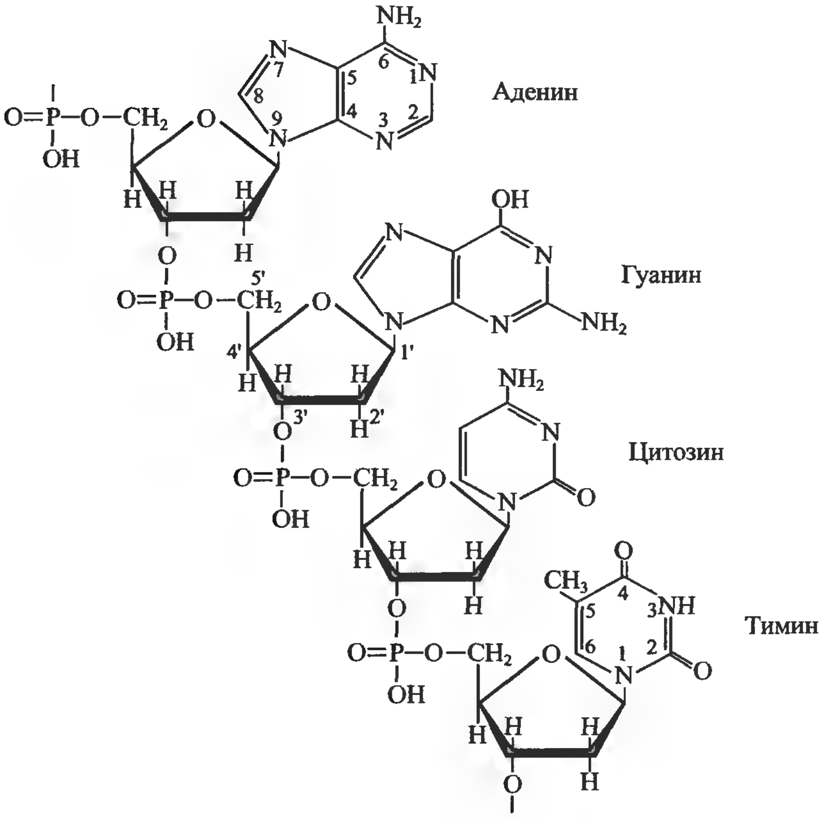
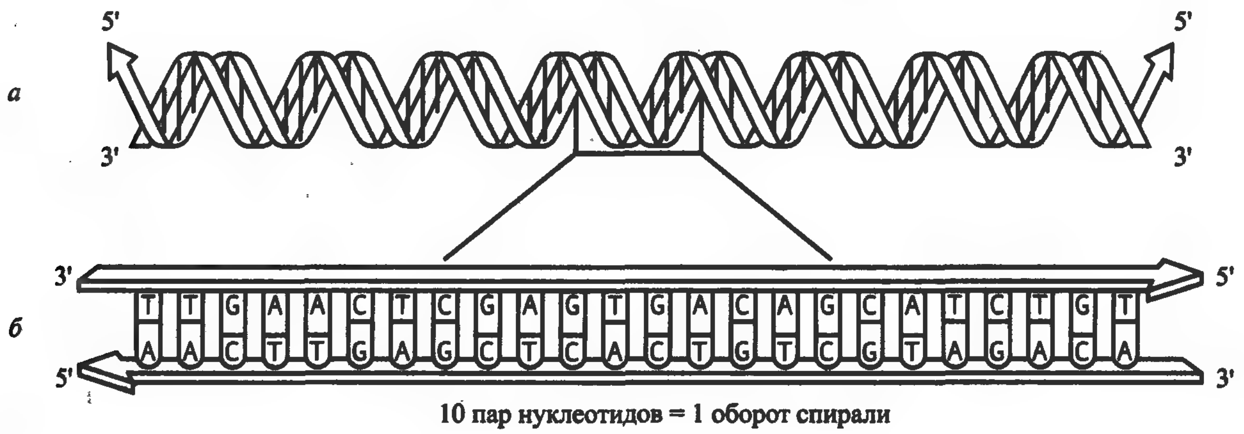


Рис. 1.1. Структура отдельного нуклеотида (*а*) и нуклеотидов, объединенных в цепочку ДНК (*б*)



в
3' T T G A A C T C G A G T G A C A G C A T C T G T 5'
5' A A C T T G A G C T C A C T G T C G T A G A C A 3'

г
5' A A C T T G A G C T C A C T G T C G T A G A C A 3'

Рис. 1.2. Различные способы схематического изображения молекулы ДНК

рым основание связано одним из своих атомов азота N-гликозидной связью (образуется нуклеозид), и фосфата, связанного эфирной связью с 5'-углеродом сахара. В ДНК имеются нуклеотиды четырех типов, различающиеся лишь азотистыми основаниями. К этим основаниям относятся два пурина (Pu) — аденин (A) и гуанин (G) — и два пиримидина (Py) — тимин (T) и цитозин (C).

Характерной особенностью ДНК является то, что ее молекула обычно состоит из двух полимерных цепей, закрученных в двойную спираль (рис. 1.2, *а*). Каждая цепь — это регулярный полимер, в котором остатки сахара двух соседних нуклеотидов связаны при помощи фосфатных групп. В образовании этой связи всегда принимают участие 5′-фосфат одного нуклеотида и 3′-гидроксил остатка сахара другого. Поэтому углеводно-фосфатный остов молекулы имеет регулярную структуру (рис. 1.3). В противоположность этому последовательность пуриновых и пиримидиновых оснований вдоль цепи в высшей степени нерегулярна, каждая молекула ДНК определенного типа характеризуется особой последовательностью.

Пуриновые и пиримидиновые основания обращены внутрь двойной спирали и расположены параллельно друг другу и перпендикулярно оси спирали. Две цепи удерживаются вместе при помощи водородных связей между парами оснований. Аденин всегда спаривается с тимином, а гуанин — с цитозином. Строгая специфичность спаривания обусловливает комплементарность, т. е. взаимное соответствие последовательностей оснований в двух цепях. При этом полинуклеотидные цепи в двойной спирали ДНК отличаются одна от другой как последовательностью оснований, так и нуклеотидным составом. По своему химическому строению две цепи молекулы ДНК ориентированы противоположно (антипараллельны). Это легко увидеть, если пометить в цепях направление от 5′-конца к 3′-концу (5′–3′) (см. рис. 1.2, 1.3).

Важным свойством ДНК является то, что 3′,5′-фосфодиэфирная связь углеводно-фосфатного остова молекулы наиболее чувствительна как к химическому, так и к ферментативному расщеплению.

Для функционирования ДНК в процессах репликации и транскрипции большое значение имеет возможность легкого расхождения цепей при определенном воздействии и их последующего воссоединения. Когда водородные связи между основаниями разрываются, цепи, образующие двухцепочечную молекулу ДНК, расходятся. ***Денатурацию*** ДНК (плавление вторичной структуры) можно осуществить в растворе, увеличивая его температуру либо изменяя pH. Стабильность двухцепочечного комплекса прямо зависит от того, сколько он содержит GC-пар, связанных тремя водородными связями (AT-пара соединена двумя водородными связями). Чем выше молярное содержание GC-пар,

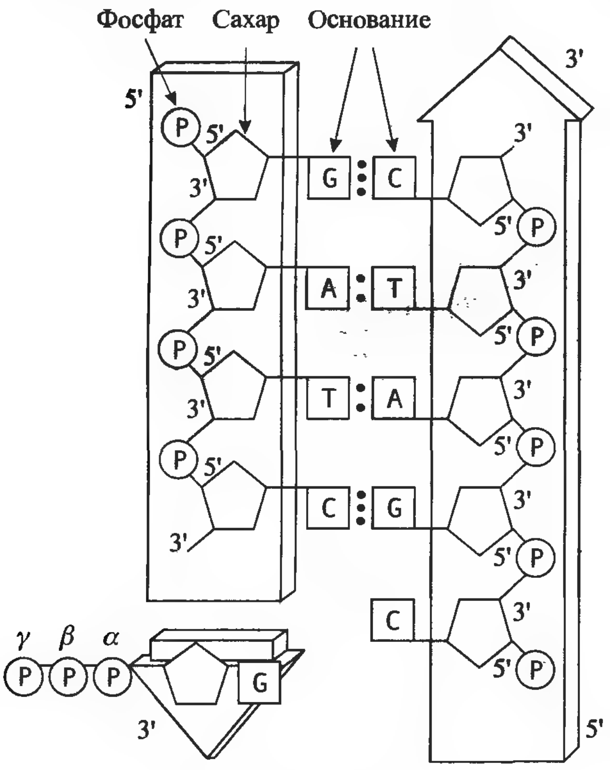


Рис. 1.3. Основные блоки, составляющие двухцепочечную молекулу ДНК.

Направление цепей определяется тем, как сахарный остаток связан с фосфатами: с помощью 5′- или 3′-связи. При наращивании цепи ДНК нуклеозидтрифосфат присоединяется к 3′-гидроксилу дезоксирибозы предшествующего нуклеотида, при этом происходит отщепление двух фосфатных групп

тем выше температура или pH, при которых происходит плавление.

Денатурация обратима даже после полного разделения двух цепей. Если инкубировать комплементарные цепи при температуре примерно на 25 °C ниже температуры плавления исходного дуплекса, то они начинают реассоциировать и при определенных условиях образуют исходную спираль. Этот процесс называется ***ренатурацией*** или отжигом.

Ренатурация ДНК осуществляется в два этапа. Сначала в результате случайных столкновений одноцепочечных молекул происходит правильное соединение коротких комплементарных отрезков. После образования таких двухцепочечных структур идет быстрое «схлопывание» по всей длине и восстановление исходной двуспиральной молекулы ДНК.

Транскрипция, т. е. считывание с молекулы ДНК матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК), соответствующей определенному гену, осуществляется ферментом РНК-полимеразой. При этом первоначально РНК-полимераза взаимодействует с определенным районом ДНК, предшествующим кодирующей последовательности гена, — промотором. Связавшись с промотором, РНК-полимераза начинает перемещаться вдоль гена, синтезируя мРНК, комплементарную одной из цепей ДНК. Синтез мРНК происходит в направлении 5′–3′. Начало гена поэтому называют 5′-концом, а конец гена, где происходит окончание транскрипции, — 3′-концом. РНК-полимераза движется по кодирующей цепи ДНК в направлении от 3′-конца к 5′-концу. По последовательности мРНК соответствует цепи ДНК, комплементарной кодирующей цепи (отличие состоит лишь в том, что в молекуле РНК вместо тимина находится урацил). Поэтому на практике очень часто записывают последовательность только одной этой цепи ДНК (см. рис. 1.2, *г*), что значительно облегчает восприятие структуры генетических элементов, так как 5′- и 3′-концы некодирующей цепи ДНК соответствуют 5′- и 3′-концам мРНК, а последовательность нуклеотидов цепи ДНК соответствует последовательности мРНК.

По мере своего перемещения РНК-полимераза расплетает и затем вновь заплетает последовательные короткие участки ДНК. Двухцепочечные гибриды ДНК–РНК, образующиеся в процессе транскрипции, существуют лишь очень непродолжительное время. Новосинтезированные цепи РНК быстро отделяются от транскрипционного комплекса, после чего транскрибированные участки ДНК возвращаются в нативное состояние.

Трансляция с мРНК белковой молекулы происходит последовательно, начиная с 5′-конца матрицы. Первую аминокислоту белковой цепи называют N-концом (или амино-концом), а последнюю — C-концом (или карбокси-концом).

Более подробно вопросы тонкой организации областей начала (инициации) и окончания (терминации) транскрипции ДНК и трансляции мРНК рассмотрены в разделах 3.2 и 3.3.

1.2. ФЕРМЕНТЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Осуществить рекомбинацию негомологичных молекул ДНК *in vitro* стало возможно лишь после открытия в конце 1960-х — начале 1970-х гг. ряда новых ферментов с уникальными свойствами, имеющих в качестве субстратов катализируемых ими реакций нуклеиновые

кислоты, и в первую очередь ДНК. Рассмотрим основные свойства ферментов, наиболее часто используемых в генно-инженерных работах.

1.2.1. Рестриктазы

Ферменты этого типа были открыты в результате подробного изучения механизма явления, получившего название «рестрикция (ограничение), контролируемая хозяином» (host-controlled restriction). В 1950-х гг. в нескольких лабораториях, изучавших развитие фагов в бактериальных клетках, было установлено, что способность бактериального вируса расти на определенных бактериальных культурах может зависеть от штамма, в котором этот фаг размножался в последний раз.

Наиболее подробно данное явление изучено для бактериофага лямбда (λ). Природным хозяином фага λ является кишечная палочка *Escherichia coli* K12. Фаг, выросший на этом штамме, обозначают $\lambda \cdot$K. Другим хозяином фага λ может быть штамм *E. coli* C. Фаговое потомство, полученное на этой бактериальной культуре, обозначается $\lambda \cdot$C. В 1953 г. Г. Бертани и Дж. Уэйгл обнаружили, что фаг $\lambda \cdot$C размножается в клетках *E. coli* K12 с очень низкой эффективностью, в то время как на *E. coli* C — хорошо.

Эффективность размножения фага определяли титрованием его препарата на газоне бактериальных клеток. Данная процедура заключается в том, что к суспензии клеток добавляют определенное количество фагового препарата и затем эту смесь равномерно наносят на прозрачную агаризованную питательную среду в чашках Петри (рис. 1.4). Через определенное время клетки образуют на поверхности твердой

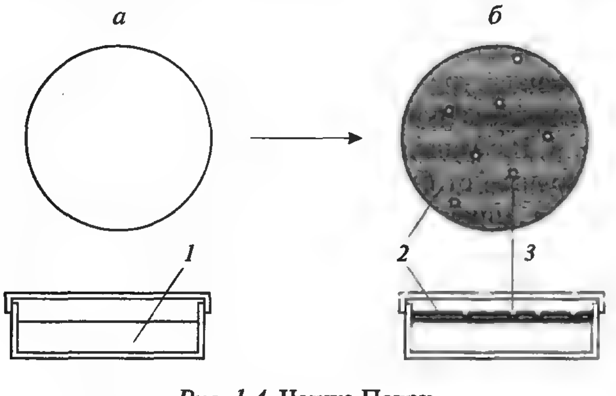


Рис. 1.4. Чашка Петри с агаризованной питательной средой:

а — до высева смеси бактерий с фагом;
б — после высева смеси бактерий с фагом и инкубации при определенных условиях. *1* — питательная среда;
2 — бактериальный газон; *3* — фаговая бляшка.
В верхнем ряду — вид сверху, в нижнем — вид сбоку

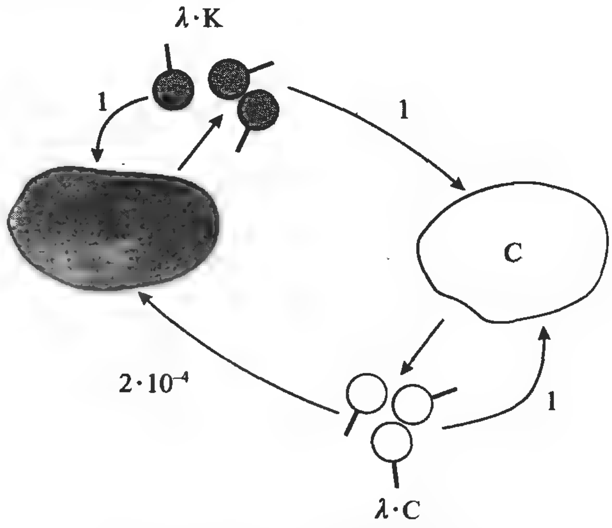


Рис. 1.5. Схема эксперимента, демонстрирующего ограничение развития фага λ, контролируемое бактерией-хозяином.

Цифрами обозначена относительная эффективность титрования препаратов фага на определенном штамме *E. coli*

среды мутную пленку газона (сплошного роста) бактериальной культуры. В тех местах, где находились клетки, инфицированные фагом, возникают прозрачные зоны лизиса, называемые обычно ***бляшками*** или ***негативными колониями***. Подсчитав число бляшек и зная количество фагового препарата, которое обусловило образование этих бляшек, можно вычислить титр (концентрацию) жизнеспособных фаговых частиц в анализируемом препарате. Титр фага выражают числом бляшкообразующих единиц в 1 мл (БОЕ/мл).

Обнаружилось, что эффективность титрования $\lambda \cdot$C на *E. coli* K12 составляла лишь $2 \cdot 10^{-4}$ относительно того же показателя на *E. coli* C (рис. 1.5). Однако немногочисленное потомство фага $\lambda \cdot$C, выросшее на *E. coli* K12, уже с одинаковой эффективностью титровалось на обоих штаммах *E. coli*. Было показано, что фаг $\lambda \cdot$K не является генетическим мутантом фага $\lambda \cdot$C. Поэтому предположили, что $\lambda \cdot$K представляет собой модифицированный вариант фага $\lambda \cdot$C и эту модификацию осуществляет клетка-хозяин.

Эксперименты с радиоактивно меченным бактериофагом показали, что ограничение роста (рестрикция) фага связано с ферментативной деградацией его ДНК в бактериальной клетке. Клеточная ДНК защищена от деградации штаммоспецифичной модификацией, которая, как выяснилось, состоит в метилировании нуклеотидов. Эти результаты позволили выдвинуть довольно исчерпывающую гипотезу о биохимических механизмах рестрикции и модификации.

Гипотеза оказалась плодотворной, и открытие ферментов рестрикции — эндодезоксирибонуклеаз, или ***рестриктаз***, — и ферментов модификации — ДНК-метилтрасфераз, часто называемых ***ДНК-метилазами***, — полностью ее подтвердило.

Таким образом, при инфицировании немодифицированным фагом $\lambda \cdot$C клеток *E. coli* K12 происходит одновременное расщепление фаговых молекул ДНК рестриктазой и метилирование их ДНК-метилазой. В результате конкуренции этих двух ферментативных процессов часть молекул ДНК фага λ ($2 \cdot 10^{-4}$) успевают модифицироваться прежде, чем они подвергнутся нуклеазной атаке. Такая метилированная ДНК дает начало модифицированному фаговому потомству $\lambda \cdot$K. Данная модификация не наследуется фагом, и при размножении $\lambda \cdot$K на *E. coli* C образуется фаговое потомство, ДНК которого снова неметилирована.

Рестриктазы узнают определенные последовательности нуклеотидов и разрезают двунитевую ДНК на фрагменты. Модификация заключается в метилировании определенных оснований в последовательности, узнаваемой сопряженной рестриктазой; тем самым обеспечивается защита данного участка ДНК от воздействия рестриктазы. Одновременное наличие в клетке этих двух ферментативных активностей (так называемая ***R–M система***) препятствует гидролизу собственной нуклеиновой кислоты. Чужеродная же ДНК при проникновении в бактериальную клетку служит субстратом для обоих ферментов.

Первоначально многие считали, что единственной функцией R–M систем является защита клеток от инфицирования фагами. Однако дальнейшие исследования позволили сделать предположение о том, что R–M системы осуществляют функцию ограничения скрещивания между различными бактериальными видами и штаммами, которая, однако, не абсолютна и позволяет части чужеродной ДНК проникать в клетку, рекомбинационно встраиваться и поддерживаться в качестве генетического фонда для получения эволюционного преимущества. Уместно заметить, что у бактерий весьма проблематично определение вида. Существуют даже предположения об общем генофонде всех микроорганизмов, что должно было бы привести к бесконечному появлению новых видов бактерий во времени. Реально же мы видим, что бактерии проявляют определенное постоянство морфологических, генетических и биохимических характеристик. Достойными кандидатами для обеспечения в эволюции относительной стабильности генетического материала, т. е. для осуществления генетической изоляции, не отрицающей обмена определенными блоками, являются системы рестрикции–модификации.

В 1968 г. М. Мезельсон и Р. Юань сообщили о выделении первой рестриктазы из штамма *E. coli* K12. Подобный фермент был получен и из штамма *E. coli* B. Данные эндонуклеазы *Eco*K и *Eco*B отличались высокой специфичностью по отношению к узнаваемой последовательности нуклеотидов, но расщепляли молекулы ДНК неспецифически в другом месте, отстоящем от участка (сайта) узнавания. В 1970 г. Х. Смит и К. Вилькокс выделили из *Haemophius influenzae* рестриктазу *Hin*dII, не только специфически узнающую, но и специфически расщепляющую молекулы ДНК. При гидролизе вирусной или плазмидной ДНК рестриктазами такого типа образуется строго определенный набор фрагментов. Это наглядно выявляется при электрофоретическом разделении смеси получающихся фрагментов (рис. 1.6).

Принципиальное значение для разработки методологии генетической инженерии имело открытие в 1971 г. Р. Ёшимори рестриктаз *Eco*RI и *Eco*RII. С помощью первой из них удалось выполнить пионерскую работу по направленной реконструкции генетического материала *in vitro*. В настоящее время рестриктазы используют практически во всех генно-инженерных экспериментах. Такое широкое применение ферментов данного типа обусловлено их высокой специфичностью, а также особенностями структуры концов фрагментов ДНК, образуемых рестриктазами. Общепринято термины рестриктаза, эндонуклеаза рестрикции, сайтспецифическая эндодезоксирибонуклеаза считать синонимами.

Х. Смит и Д. Натанс в 1973 г. предложили номенклатуру рестриктаз, которая включает следующие пункты:

1. Название каждого фермента является производным от бинарного родо-видового обозначения микроорганизма-хозяина, содержащего данную R–M систему, и составляется по следующему правилу: к первой прописной букве названия рода добавляют две первые строчные буквы вида. Например: *Streptomyces albus* — *Sal*, *Escherichia coli* — *Eco*.

2. За родо-видовым названием следует, в случае необходимости, обозначение серотипа или штамма: *Haemophilus influenzae* **d** — *Hin*d, *Escherichia coli* **B** — *Eco*B.

3. Различные системы рестрикции–модификации, кодируемые одной и той же бактериаль-

ной клеткой, обозначаются римскими цифрами, например: *Hin*dI, *Hin*dII, *Hin*dIII.

4. Ферменты рестрикции–модификации в общем виде обозначаются как эндонуклеаза R или метилаза M с последующим определением названия системы, например: эндонуклеаза R·*Hin*dII или метилаза M·*Hin*dII.

5. Если система генетически локализована в геноме фага или на плазмиде, то после родовидового названия указывается символ внехромосомного элемента: *Eco*PI, *Eco*RII. Штаммовая принадлежность в этих случаях указывается в скобках: *Eco*(K)PI.

Основные принципы, заложенные в этой номенклатуре, используются и в настоящее время. Однако неоднозначность в названиях, возникшая из-за лавинообразного открытия новых рестриктаз, заставила Р. Робертса в 1978 г. внести некоторые дополнения в вышеописанную систему рациональных обозначений ферментов. Смысл дополнений заключается в том, что во избежание путаницы в случае, когда название совпадает для нескольких ферментов, оставляют неизменными первые две буквы, а третью берут из последующих букв видового названия, например: ***Haemophilus parainfluenzae* — *Hpa*I, *Haemophilus parahaemolyticus*** — *Hph*I. Для большей точности Д. Шибата с соавторами предложили после латинской родо-видовой символики вводить музейный номер бактериальной культуры, например: *Pvu*84II, *Hin*b1076III.

Открытие большого числа рестриктаз и изучение их свойств позволило выявить некоторые закономерности функционирования ферментов и разделить их на три класса. Основой классификации служат в первую очередь потребность фермента в кофакторах и характер расщепления ДНК (табл. 1.1).

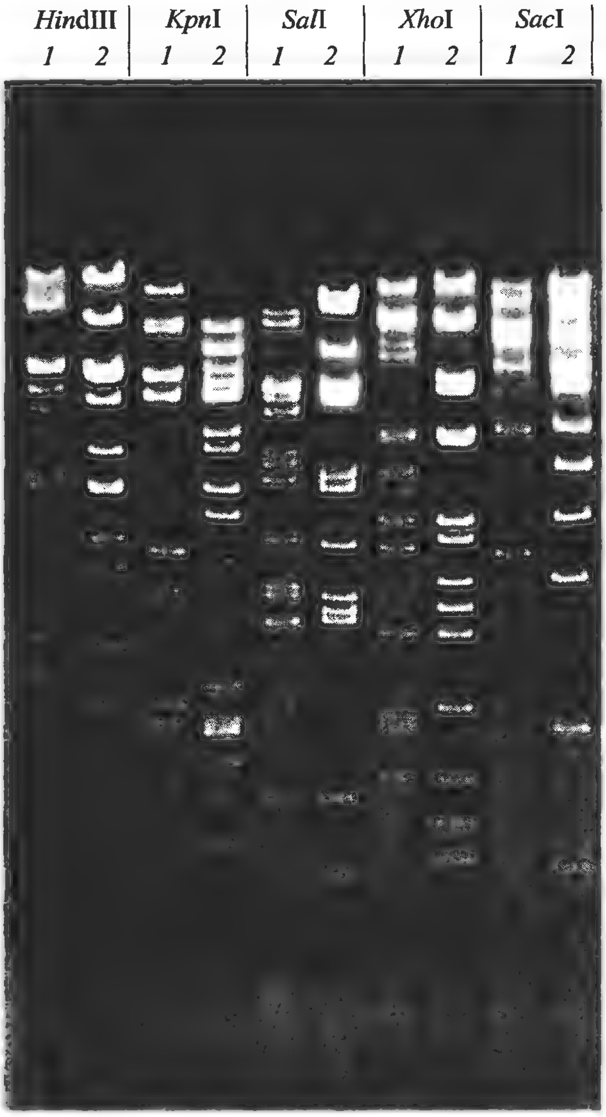


Рис. 1.6. Результаты электрофоретического разделения фрагментов ДНК близкородственных вирусов осповакцины, штамм ЛИВП (*1*) и натуральной оспы, штамм Индия-1967 (*2*), полученных после гидролиза вирусных ДНК рестриктазами (0,6 % агарозный гель).

Рестриктазы класса I. Наиболее изученными рестриктазами класса I являются ферменты *Eco*K и *Eco*B, выделенные соответственно из клеток *E. coli* K12 и *E. coli* B. Это ферменты с очень схожей структурой. Оба содержат три типа неидентичных субъединиц с молекулярной массой 135, 60 и 50 кДа (α, β и γ), хотя соотношение субъединиц различается для этих двух ферментов. Например, *Eco*K имеет структуру $\alpha_2\beta_2\gamma$. В случае *Eco*B ситуация более сложная, так как выявлены по крайней мере три активные олигомерные структуры, основная из которых имеет состав $\alpha_2\beta_4\gamma_2$.

Рестриктазы класса I специфичны к немодифицированной двухцепочечной ДНК и обладают следующими свойствами: требуют в качестве кофакторов аденозинтрифосфат (ATP), S-аденозинмонофосфат (SAM), ионы Mg^{2+}. Расщепление ДНК совмещено с гидролизом ATP. В едином субъединичном белке имеются такие ферментативные активности, как расщепление ДНК (α-субъединица), метилирование ДНК (β-субъединица) и узнавание специфической последовательности ДНК (γ-субъединица).

Ферменты *Eco*B и *Eco*K узнают строго специфичные последовательности, соответственно

5′ TGANNNNNNNNTGCT 3′
3′ ACTNNNNNNNNACGA 5′

и

5′ AACNNNNNNGTGC 3′
3′ TTGNNNNNNCACG 5′

Таблица 1.1. **Свойства рестриктаз R–M систем разных классов**

Структура и функции белка	Молекулярная масса, кДа	Кофакторы	Узнаваемая последовательность (пример)	Место расщепления
		I класс		
Сложная молекула с тремя различными типами субъединиц (эндонуклеаза, метилаза, фермент узнавания)	400–600	SAM, ATP, Mg^{2+}	Непалиндромная структура *Spt*SQI: 5′ $AAC(N)_6PuTAPyG$ 3′ 3′ $TTG(N)_6PyATPuC$ 5′	Обычно более чем через 400 пн от сайта узнавания, гидролиз неспецифичен
		II класс		
Эндонуклеаза и метилаза — разные молекулы, димеры одинаковых субъединиц	50–100	Mg^{2+}	Обычно палиндромная последовательность из 4–8 нуклеотидов *Bam*HI: 5′ GGATCC 3′ 3′ CCTAGG 5′ Подкласс IIS — непалиндромная последовательность *Hga*I: 5′ GACGC 3′ 3′ CTGCG 5′	Внутри сайта узнавания В стороне от узнаваемой последовательности на строго определенном расстоянии (не более 20 пн)
		III класс		
Сложная молекула с двумя субъединицами (эндонуклеаза, метилаза)	200–300	ATP, Mg^{2+} (SAM — стимулирует активность)	Непалиндромная структура *Hin*eI: 5′ CGAAT 3′ 3′ GCTTA 5′	В стороне от сайта узнавания на расстоянии 24–27 пн

Однако разрыв ДНК происходит случайным образом на значительном расстоянии от участка узнавания — от 400 до 7000 пар нуклеотидов (пн). Продукты расщепления ДНК гетерогенны.

Ф. Студиэр и П. Бэндепедхяй в 1988 г. на основе подробного изучения гидролиза ДНК фага T7 рестриктазой *Eco*K предложили общую модель действия рестриктаз класса I на ДНК. Суть этой модели состоит в том, что рестриктаза класса I после взаимодействия с ДНК в участке узнавания начинает осуществлять ATP-зависимую транслокацию (перемещение) цепей ДНК через себя в обоих направлениях (рис. 1.7). При встрече двух соседних молекул фермента, транслоцирующих ДНК, они разрезают двухцепочечную ДНК в районе контакта. Гетерогенность продуктов гидролиза ДНК рестриктазами класса I может объясняться неодновременным случайным взаимодействием молекул фермента с разными участками узнавания на каждой молекуле ДНК, а следовательно, неодновременным началом транслокации цепей ДНК. Кроме того, не исключена возможность неравномерной транслокации цепей на разных молекулах препарата ДНК.

Рестриктазы класса II. Системы рестрикции–модификации класса II состоят из отдельных белков рестрикционной эндонуклеазы и модификационной метилазы. Поэтому рестриктазы данного класса можно выделить в индивидуальном состоянии, свободном от метилазной активности, что в значительной мере упрощает их изучение и последующее использование для расщепления молекул ДНК.

Рестриктазы класса II — относительно просто организованные белки, состоящие из двух субъединиц одного типа со сравнительно небольшой молекулярной массой. Отличительной чертой рестриктаз класса II является то, что они узнают и разрезают немодифицированную двухцепочечную молекулу ДНК по специфичным нуклеотидным последовательностям, и это приводит к образованию дискретного набора фрагментов анализируемой ДНК (см. рис. 1.6). Для специфического действия этих ферментов требуются только ионы Mg^{2+} в физиологических концентрациях. Рестриктазы класса II обычно узнают последовательности двухцепочечной ДНК длиной от 4 до 8 пн, имеющие ось симметрии второго порядка, — ***палиндромы***.

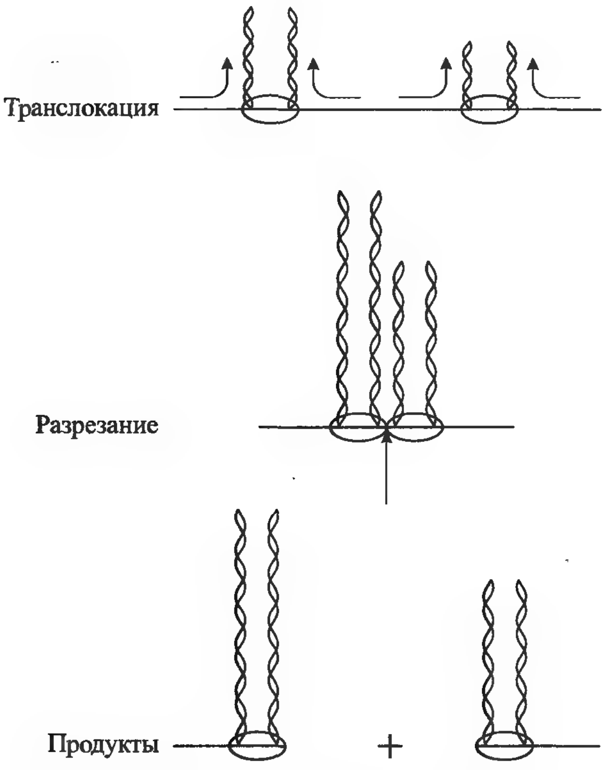


Рис. 1.7. Модель действия рестриктаз класса I на молекулу ДНК

При этом ряд рестриктаз расщепляет ДНК строго по оси симметрии узнаваемой последовательности, что приводит к образованию фрагментов ДНК с ***тупыми концами***, не имеющими выступающих одноцепочечных участков. Например, рестриктаза *Alu*I, схема участка узнавания которой представлена на рис. 1.8, осуществляет гидролиз ДНК следующим образом:

```
              ↓
5′...N-N-A-G-C-T-N-N...3′
3′...N-N-T-C-G-A-N-N...5′
              ↑
5′...N-N-A-G 3′   +   5′...C-T-N-N...3′
3′...N-N-T-C 5′       3′...G-A-N-N...5′
```

Другой фермент — *Eco*RI — узнает гексануклеотидную последовательность и расщепляет ее с образованием взаимокомплементарных одноцепочечных ***липких концов***:

```
            ↓
5′...N-N-G-A-A-T-T-C-N-N...3′
3′...N-N-C-T-T-A-A-G-N-N...5′
                    ↑
5′...N-N-G 3′           + 5′ A-A-T-T-C-N-N...3′
3′...N-N-C-T-T-A-A 5′        3′ G-N-N...5′
```

Если гидролизовать молекулы ДНК различного происхождения рестриктазой *Eco*RI, то в каждом случае будет образовываться строго определенный специфический набор фрагментов ДНК. Важно подчеркнуть, что все фрагменты при этом будут иметь идентичные липкие концы. При смешивании разных препаратов таких фрагментов ДНК в определенных условиях липкие концы могут реассоциировать (слипаться) за счет комплементарных взаимодействий, и таким образом могут стыковаться фрагменты молекул ДНК, выделенных из любых организмов. Данные свойства в первую очередь и сделали рестриктазы класса II ферментами, наиболее часто используемыми при конструировании гибридных молекул ДНК.

Кроме выступающих 5′-концов рестриктазы могут образовывать также липкие 3′-концы. К подобным ферментам относится рестриктаза *Pst*I:

```
                        ↓
5′...N-N-C-T-G-C-A-G-N-N...3′
3′...N-N-G-A-C-G-T-C-N-N...5′
          ↑
5′...N-N-C-T-G-C-A 3′ +        5′ G-N-N...3′
3′...N-N-G 5′             3′A-C-G-T-C-N-N...5′
```

Некоторые из рестриктаз класса II перечислены в табл. 1.2. Для краткости изображена одна цепь узнаваемой последовательности нуклеотидов в направлении 5′–3′. Вторая цепь расщепляется симметрично, как в приведенных выше примерах для рестриктаз *Alu*I, *Eco*RI и *Pst*I.

Ряд рестриктаз узнают частично вырожденные последовательности, поэтому такие ферменты не обладают столь высокой специфичностью, как рассмотренные выше. Например, *Hin*dII узнает и расщепляет последовательности с общей формулой GTPy↓PuAC; *Eco*RII — ↓CC($^{A}_{T}$)GG; *Hae*I — ($^{A}_{T}$)GG↓CC($^{T}_{A}$). Так, по-

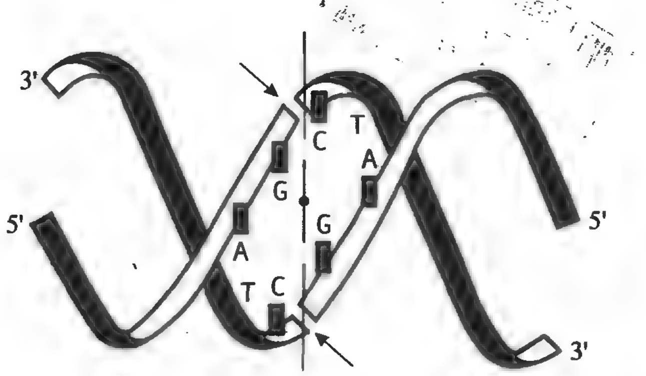


Рис. 1.8. Строение участка расщепления молекулы ДНК рестриктазой *Alu*I.

Штриховая линия — ось симметрии; стрелками обозначены места гидролиза цепей ДНК

Таблица 1.2. **Некоторые рестриктазы класса II**

Фермент	Узнаваемая и гидролизуемая последовательность[1]	Микроорганизм — источник фермента
*Alu*I	AG↓CT	*Arthrobacter luteus*
*Bam*HI	G↓GATCC	*Bacillus amyloliquefaciens* H
*Bgl*I	GCCNNNN↓NGGC	*Bacillus globigii*
*Bgl*II	A↓GATCT	*Bacillus globigii*
*Bme*12I	↓GATC	*Bacillus megaterium* 12
*Bsp*RI	GG↓CC	*Bacillus sphaericus* R
*Bst*I	G↓CATGC	*Bacillus stearothermophilus*
*Cvi*II	G↓TAC	*Chlorella*, инфицированная вирусом NY-2A
*Cvi*JI	PuG↓CPy	*Chlorella*, инфицированная вирусом IL-3A
*Eco*RI	G↓AATTC	*Escherichia coli* RY13
*Eco*RII	↓CC$(^{A}_{T})$GG	*Escherichia coli* R245
*Fse*I	GGCCGG↓CC	*Frankia* sp. EuII b
*Hae*I	$(^{A}_{T})$GG↓CC$(^{T}_{A})$	*Haemophilus aegyptius*
*Hae*II	PuGCGC↓Py	*Haemophilus aegyptius*
*Hae*III	GG↓CC	*Haemophilus aegyptius*
*Hap*II	C↓CGG	*Haemophilus aphrophilus*
*Hind*II	GTPy↓PuAC	*Haemophilus influenzae* Rd
*Hind*III	A↓AGCTT	*Haemophilus influenzae* Rd
*Hpa*II	C↓CGG	*Haemophilus parainfluenzae*
*Kpn*I	GGTAC↓C	*Klebsiella pneumoniae*
*Mae*III	↓GTNAC	*Methanococcus aeolicus*
*Mno*I	C↓CGG	*Moraxella nonliquefaciens*
*Mse*I	T↓TAA	*Micrococcus* sp.
*Nci*I	CC↓$(^{G}_{C})$GG	*Neisseria cinerea*
*Not*I	GC↓GGCCGC	*Nocardia otitidis-caviarum*
*Pac*I	TTAAT↓TAA	*Pseudomonas alcaligenes*
*Pme*I	GTTT↓AAAC	*Pseudomonas mendocina*
*Pst*I	CTGCA↓G	*Providencia stuartii*
*Rsa*I	GT↓AC	*Rhodopseudomonas sphaeroides*
*Rsr*II	CG↓G$(^{A}_{T})$CCG	*Rhodopseudomonas sphaeroides*
*Sal*I	G↓TCGAC	*Streptomyces albus*
*Sau*3AI	↓GATC	*Staphylococcus aureus* 3A
*Sfi*I	GGCCNNNN↓NGGCC	*Streptomyces fimbriatus*
*Sma*I	CCC↓GGG	*Serratia marcescens*
*Swa*I	ATTT↓AAAT	*Staphylococcus warneri*
*Tth*111I	GACN↓NNGTC	*Thermus thermophilus* 111
*Vsp*I	AT↓TAAT	*Vibrio* sp.
*Xma*I	C↓CCGGG	*Xanthomonas malvacearum*
*Xmn*I	GAANN↓NNTTC	*Xantomonas manihotis*

[1] N — любой из четырех нуклеотидов, Pu — пурин, Py — пиримидин, $(^{A}_{T})$ — либо A, либо T (аналогично либо C, либо G); вертикальная стрелка обозначает место гидролиза в одной цепи ДНК.

следовательности, специфичные для *Hin*dII, имеют следующий вид: GTTAAC, GTCAAC, GTCGAC, GTTGAC.

*Eco*RII при гидролизе ДНК образует два типа липких концов:

```
5' CCAGGNN... 3'              5' CCTGGNN... 3'
      3' NN... 5'      и            3' NN... 5'
```

Это означает, что не все фрагменты ДНК, генерируемые *Eco*RII, могут объединяться между собой.

Размер узнаваемой рестриктазой последовательности, как правило, обусловливает частоту встречаемости этих участков в природных ДНК. Для случайной последовательности ДНК бесконечной длины с равным содержанием каждого из четырех нуклеотидов вероятность наличия определенной последовательности длиной N (P_N) на молекуле ДНК будет равна 4^{-N}, причем вырожденность последовательности участков узнавания, обнаруженная для некоторых рестриктаз, увеличивает данную вероятность. Средняя частота встречаемости тетрануклеотида — $P_4 = 4^{-4} = 3{,}9 \cdot 10^{-3}$, октануклеотида — $P_8 = 1{,}2 \cdot 10^{-5}$. Поэтому рестриктазы, узнающие последовательность из четырех пар нуклеотидов, часто называют мелкощепящими, а рестриктазы с участком узнавания в шесть и более пар нуклеотидов — крупнощепящими.

Большой интерес для экспериментов по клонированию фрагментов ДНК представляют рестриктазы, которые, обладая разной специфичностью, дают при гидролизе ДНК одинаковые липкие концы. К ним относятся, например, *Bam*HI, *Sau*3AI, *Bgl*II (см. табл. 1.2). После соединения одинаковых липких концов, возникающих при действии на ДНК различных рестриктаз, обычно образуются гибридные последовательности, уже не узнаваемые некоторыми из этих ферментов. Так, если соединить *Bam*HI- и *Bgl*II-липкие концы, то получается последовательность, которая не будет узнаваться ни *Bam*HI, ни *Bgl*II, но может быть расщеплена *Sau*3AI:

```
5'...NNG 3'              5' GATCTNN...3'
3'...NNCCTAG 5'    +         3' ANN...5'
                   |
                   |  ДНК-лигаза
                   ↓
          5'...NNGGATCTNN...3'
          3'...NNCCTAGANN...5'
```

Целенаправленный поиск эндонуклеаз рестрикции класса II, обусловленный значением этих ферментов, привел к открытию большого

Таблица 1.3. **Сводные данные об открытии рестриктаз**

Год	Рестриктазы	Прототипы
1976	84	22
1980	227	54
1984	503	103
1986	710	126
1988	839	152
2002	3516	211

числа новых рестриктаз (табл. 1.3). Новой считается любая рестриктаза, найденная в не изученном ранее штамме. Дальнейшие исследования позволяют решить, действительно ли данный фермент узнает новую последовательность нуклеотидов или же является аналогом уже известной рестриктазы. В том случае, если обнаруженная рестриктаза узнает ранее неизвестную последовательность, она называется ***прототипом***. Однако часто ферменты, выделенные из различных микроорганизмов, узнают одну и ту же последовательность и при гидролизе определенной ДНК образуют одинаковый спектр фрагментов. Такие рестриктазы называют ***изошизомерами***. В то же время, узнавая одну и ту же последовательность, рестриктазы могут по-разному расщеплять двухцепочечную ДНК. Поэтому ферменты, имеющие одинаковые узнаваемые последовательности и одинаково их расщепляющие, принято называть истинными изошизомерами. Например, рестриктазы *Hap*II, *Hpa*II, *Mno*I являются истинными изошизомерами. Рестриктазы же *Sma*I и *Xma*I, а также *Rsa*I и *Cvi*II имеют попарно одинаковые узнаваемые последовательности, но расщепляют ДНК различным образом (см. табл. 1.2). Такие ферменты принято называть ложными изошизомерами.

Как уже отмечалось, подавляющее большинство рестриктаз класса II используют в качестве субстрата немодифицированную ДНК. Однако выявлены рестриктазы данного класса, которые расщепляют *in vitro* только метилированные последовательности ДНК. Например, фермент *Dpn*I из *Diplococcus pneumonia* расщепляет лишь метилированную двухцепочечную ДНК по последовательности 5′GmA↓TC 3′. Другая рестриктаза из данной бактерии — *Dpn*II — гидролизует немодифицированную ДНК и узнает те же участки 5′GA↓TC 3′, но уже не метилированные.

Прилегающие к участку узнавания районы на молекуле ДНК оказывают заметное влияние на эффективность ее гидролиза. В лаборатории

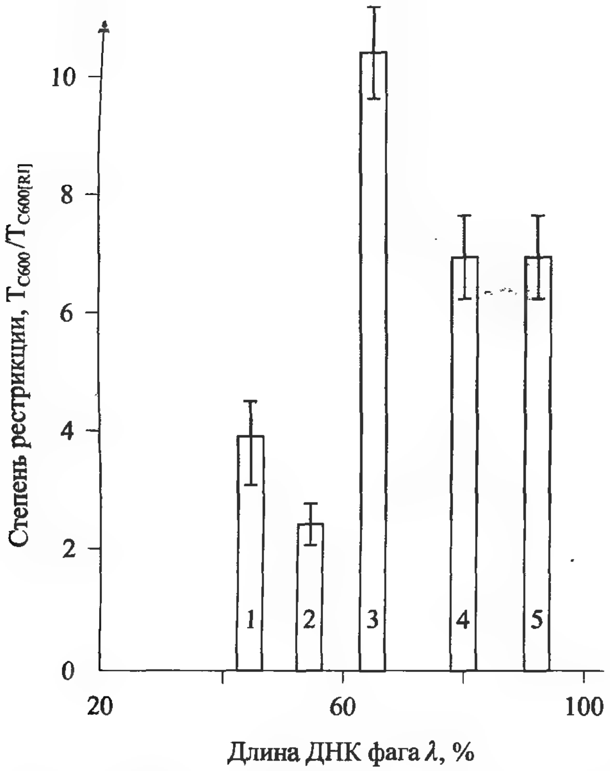


Рис. 1.9. Рестрикция *in vivo* по участкам действия рестриктазы *Eco*RI на ДНК фага λ:

1–5 — индивидуальные участки гидролиза *Eco*RI (srI λ1–5 соответственно).
Т — титр фага на соответствующем штамме *E. coli*

С. Н. Щелкунова был использован набор фагов λ, мутантных по разным участкам гидролиза фаговой ДНК рестриктазой *Eco*RI (см. 2.2.2). Это позволило в системе *in vivo* оценить частоту расщепления фаговой ДНК по каждому из пяти мест действия данного фермента (рис. 1.9). Значительные различия в скорости гидролиза ДНК фага λ по индивидуальным местам узнавания рестриктазой *Eco*RI продемонстрированы также в системе *in vitro*. С данным эффектом исследователи обычно сталкиваются при обработке вирусной или плазмидной ДНК в условиях неполного гидролиза рестриктазой, имеющей несколько мест действия на субстратной ДНК. По одним из участков гидролиза в этих случаях расщепление ДНК происходит с заметно большей эффективностью, чем по другим. Поэтому для исчерпывающего гидролиза молекул ДНК в анализируемом препарате, как правило, берут некоторый избыток рестриктазы.

Внесение большого избытка рестриктазы класса II в реакционную смесь может вызывать наряду с нормальным гидролизом расщепление ДНК по дополнительным участкам. Нарушение специфичности действия рестриктаз может также происходить при снижении ионной силы, повышении pH раствора, при введении в раствор органических растворителей или ионов Mn^{2+}. Так, при изменении определенным образом pH и ионной силы реакционной смеси рестриктаза *Eco*RI специфически узнает не гексануклеотидную последовательность G↓AATTC, а укороченную тетрануклеотидную ↓AATT. Фермент с такой измененной активностью обозначается *Eco*RI*. Рестриктаза *Hin*dIII в оптимальных условиях имеет участок узнавания A↓AGCTT. При внесении в реакционный буфер 15 % диметилсульфоксида *Hin*dIII* расщепляет ДНК по последовательностям:

$$\mathrm{Pu{\downarrow}AGCTT},\quad \mathrm{A{\downarrow}}\begin{pmatrix}\mathrm{A}\\ \mathrm{G}\\ \mathrm{T}\end{pmatrix}\mathrm{GCTT},\quad \mathrm{A{\downarrow}A}\binom{\mathrm{G}}{\mathrm{T}}\mathrm{CTT},$$

A↓AGCNT, A↓AGCTPy.

Важно отметить, что спермидин (полиамин, являющийся существенным компонентом прокариотических клеток) значительно увеличивает точность гидролиза ДНК рестриктазами класса II *in vitro*. Это свидетельствует, что в клетке ошибочный гидролиз ДНК рестриктазой если и происходит, то крайне редко.

Гены R–M систем могут локализоваться на бактериальных хромосомах, плазмидах, вирусных ДНК. Ряд генов R–M систем класса II удалось проклонировать и расшифровать последовательность их нуклеотидов. Наблюдается большое разнообразие генетической организации систем рестрикции–модификации у разных микроорганизмов (рис. 1.10), но общим является сцепленность генов *r* (рестриктазы) и *m* (метилазы) и строгая координация их экспрессии. В частности, это показано для системы рестрикции–модификации *Eco*RI, имеющей термочувствительную мутацию по гену метилазы. При непермиссивной температуре (при которой метилаза инактивирована, а рестриктаза нативна) происходит гибель клеток из-за расщепления собственной ДНК.

Внутри рассматриваемого класса рестриктаз открыты ферменты, узнающие непалиндромные структуры и расщепляющие ДНК на строго фиксированном расстоянии от участка узнавания с образованием как тупых, так и липких концов (табл. 1.4). По предложению В. Шибальского данные ферменты отнесли к подклассу IIS (от англ. shift — сдвиг). Особенно интересны рестриктазы, образующие при гидролизе достаточно длинные липкие концы. В каждом месте гидролиза молекулы ДНК такие липкие концы имеют уникальную последовательность. Это позволяет при необходимости направленно собирать генерированные данными рестрикта-

зами фрагменты с восстановлением исходной структуры вирусной или плазмидной ДНК.

Так, П. Мозес и К. Хориучи (1979 г.) продемонстрировали, что репликативную форму ДНК фага f1, расщепленную рестриктазой *Hga*I на шесть фрагментов, можно с помощью ДНК-лигазы с высокой эффективностью собирать в биологически активную кольцевую ДНК, дающую после трансфекции клеток начало фаговому потомству. При гидролизе той же фаговой ДНК рестриктазой класса II, формирующей одинаковые липкие концы, уже практически невозможно из шести фрагментов в процессе лигазной реакции восстановить молекулу ДНК нативной структуры, так как все фрагменты будут объединяться статистически в самых различных комбинациях.

Уникальные свойства рестриктаз подкласса IIS, заключающиеся в пространственной разобщенности участков узнавания и гидролиза ДНК, позволили А. Подхайской и В. Шибальскому в 1985 г. предложить оригинальный подход к расщеплению одноцепочечной молекулы ДНК в любом заданном месте. Суть процедуры состоит в том, что синтезируется олигонуклеотид, на одном конце которого находится взаимокомплементарная последовательность, способная образовывать двухцепочечную шпильку (рис. 1.11). В этой шпильке имеется участок узнавания рестриктазы подкласса IIS. Другой, одноцепочечный конец искусственного олигонуклеотида комплементарен выбранному району кольцевой одноцепочечной ДНК и может образовывать с ней комплекс. Обработка полученного комплекса рестриктазой позволяет ввести разрез в выбранной точке одноцепочечной ДНК. При использовании фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* можно осуществить реакцию полимеризации второй цепи ДНК, достроить одноцепочечные липкие концы до тупых, встроить по месту расщепления целевой фрагмент ДНК и т. п. Авторы в качестве модельных использовали рестриктазу *Fok*I и одноцепочечную ДНК фага M13mp7.

Особенности рестриктаз подкласса IIS используют также при создании специализированных клонирующих векторов, имеющих большое значение для сборки генов из химически синтезированных блоков.

Рестриктазы класса III имеют некоторое сходство с рестриктазами класса I. Нативный фермент состоит из двух различных субъединиц и бифункционален, т. е. обладает как рестриктазной, так и метилазной активностью. Рестриктазы класса III узнают несимметричные по-

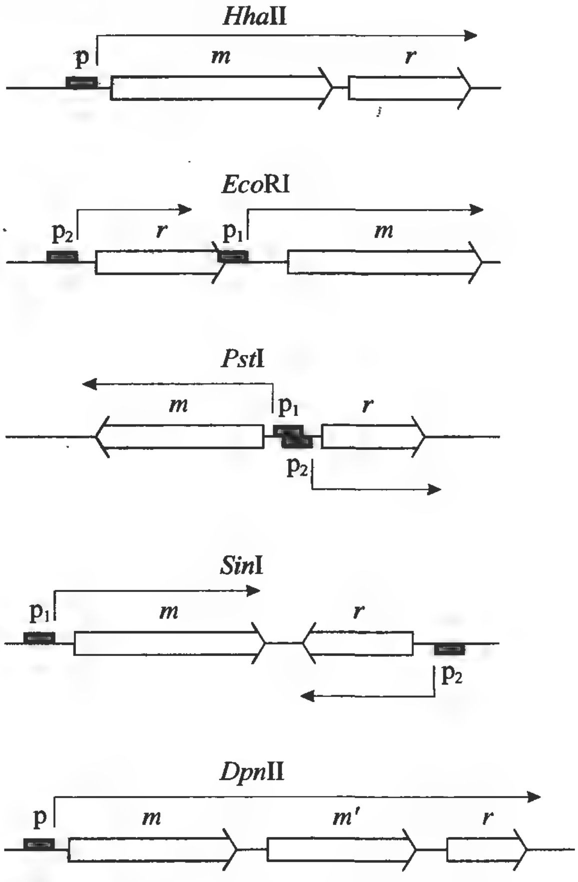


Рис. 1.10. Примеры организации генов R–M систем класса II:

p_1 — промотор, к которому РНК-полимераза *E. coli* имеет большее сродство, чем к промотору p_2; *r*, *m* — соответственно ген рестриктазы и метилазы; стрелками над генами обозначены единицы транскрипции

следовательности длиной 5–6 пн и расщепляют ДНК в стороне от участков узнавания на расстоянии 24–27 пн, образуя одноцепочечные 5′-концы длиной 2–3 нуклеотида. Для проявления эндонуклеазной активности требуются только ATP и ионы Mg^{2+}, а SAM лишь стимулирует реакцию, причем расщепление ДНК не сопровождается гидролизом ATP. При действии ферментов данного класса *in vitro* не удается исчерпывающе гидролизовать ДНК. Причины этого пока не ясны.

Распространенность рестриктаз. Рестриктазы необычайно широко распространены в мире микроорганизмов. Показано, что рестрикция и модификация не коррелируют с патогенностью. Не обнаружено и зависимости от потребления кислорода, т. е. R–M системы имеются и в аэробах, и в анаэробах. Строение клеточной стенки также не накладывает ограничений на присутствие систем рестрикции–модификации. Необходимо подчеркнуть, что рестриктазы и метилазы не являются обязательными компо-

Таблица 1.4. **Рестриктазы подкласса IIS**

Фермент	Узнаваемая и гидролизуемая последовательность	Микроорганизм — источник фермента
*Bbv*I	GCAGC(N)$_8$* CGTCG(N)$_{12}$	*Bacillus brevis*
*Bbv*II	GAAGAC(N)$_2$ CTTCTG(N)$_6$	*Bacillus brevis*
*Bin*I	GGATC(N)$_4$ CCTAG(N)$_5$	*Bifidobacterium infanis*
*Bsp*MI	ACCTGC(N)$_4$ TGGACG(N)$_8$	*Bacillus* sp. M
*Eco*31I	GGTCTC(N)$_1$ CCAGAG(N)$_5$	*Escherichia coli* RFL31
*Eco*57I	CTGAAA(N)$_{16}$ GACTTT(N)$_{14}$	*Escherichia coli* RFL57
*Fok*I	GGATG(N)$_9$ CCTAC(N)$_{13}$	*Flavobacterium okeanokoites*
*Hga*I	GACGC(N)$_5$ CTGCG(N)$_7$	*Haemophilus gallinarum*
*Hph*I	GGTGA(N)$_8$ CCACT(N)$_7$	*Haemophilus parahaemolyticus*
*Mbo*II	GAAGA(N)$_8$ CTTCT(N)$_7$	*Moraxella bovis*
*Mme*I	TCC($^{A}_{G}$)AC(N)$_{20}$ AGG($^{C}_{T}$)TG(N)$_{18}$	*Methylophilus methylotrophus*
*Mnl*I	CCTC(N)$_7$ GGAG(N)$_7$	*Moraxella nonliquefaciens*
*Sfa*NI	GCATC(N)$_5$ CGTAG(N)$_9$	*Streptococcus faecalis*
*Taq*II	($^{G}_{C}$)ACC($^{G}_{C}$)A(N)$_{11}$ ($^{G}_{C}$)TGG($^{G}_{C}$)T(N)$_9$	*Thermus aquaticus*
*Tth*111II	CAAPuCA(N)$_{11}$ GTTPyGT(N)$_9$	*Thermus thermophilus* 111

* Расщепление молекулы ДНК происходит в верхней цепи на расстоянии 8 нуклеотидов от сайта узнавания, в нижней — 12 нуклеотидов; далее аналогично.

нентами клетки. Штаммы, не содержащие R–M систем, иногда называют «нулевыми».

Распространенность рестриктаз в царстве прокариот поставила вопрос о возможности существования R–M систем в эукариотических клетках. Попытки обнаружить у эукариот ферменты, аналогичные рестриктазам класса II, долгое время не давали положительных результатов. В середине 1980-х гг. появились сообщения о выделении специфических эндонуклеаз из *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranafaciens*, *Chlamydomonas reinhardtii*. Однако данные ферменты не давали исчерпывающего гидролиза ДНК, чем напоминали рестриктазы класса III.

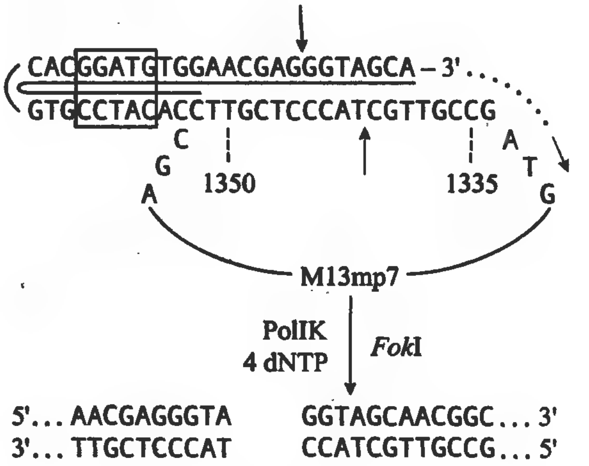


Рис. 1.11. Схема метода направленного введения разрыва в кольцевую одноцепочечную ДНК фага M13 с помощью рестриктазы подкласса IIS (*Fok*I).

Прямоугольником обведена последовательность на синтетическом олигонуклеотиде (подчеркнут), узнаваемая *Fok*I; вертикальными стрелками обозначены места гидролиза ДНК рестриктазой *Fok*I; пунктирная стрелка указывает направление достройки второй цепи фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*

Несомненный интерес представляют работы Я. Ксиа с соавторами, которые начиная с 1986 г. описали ряд индуцируемых вирусами рестриктаз, выделенных из зеленой хлореллоподобной водоросли (см. табл. 1.2). Активность рестриктазоподобного фермента *Cre*I из *Chlamydomonas reinhardtii* проявляется только в зиготах и направлена исключительно на гидролиз хлоропластной ДНК одного из партнеров. Исходя из теории эндосимбиоза, можно с большой вероятностью предполагать, что хлоропласты произошли из цианобактерий, поэтому нетрудно проследить связь рестриктазоподобного фермента *Cre*I с прокариотической организацией. Эндосимбиоз возник на ранних стадиях развития жизни на Земле, поэтому системы рестрикции–модификации, скорее всего, имеют очень древнее происхождение и связаны с одноклеточной организацией живого.

Всю информацию о рестриктазах и метилтрансферазах можно найти на веб-сайте www.rebase.neb.com, который регулярно обновляется.

1.2.2. ДНК-лигаза

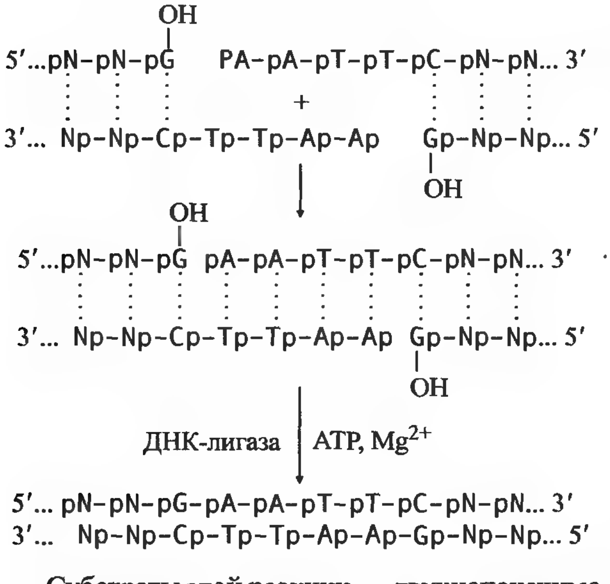
В 1961 г. М. Мезельсон и Дж. Вейгл на примере фага λ показали, что рекомбинация (кроссинговер) включает разрыв и последующее воссоединение молекул ДНК. Эта работа дала импульс поиску ферментов, участвующих в про-

цессе рекомбинации. Вскоре при изучении фагов λ и Т4 были выявлены фагоспецифичные нуклеазы, необходимые для осуществления фаговой рекомбинации. Это указывало на правильность предложенной гипотезы о механизме кроссинговера. Начались интенсивные поиски фермента, участвующего в воссоединении расщепленных нуклеазами молекул ДНК. В 1967 г. независимо в нескольких лабораториях был открыт фермент, названный ДНК-лигазой, который катализирует синтез фосфодиэфирной связи в двухцепочечной ДНК.

Удалось обнаружить два типа ДНК-лигаз: фермент, синтезируемый в клетках *E. coli*, и фермент, появляющийся в клетках *E. coli*, инфицированных фагом Т4. Они различались по потребностям в кофакторах. ДНК-лигаза *E. coli* в качестве кофактора требует дифосфопиридиннуклеотид, в то время как лигаза фага Т4 — аденозинтрифосфат. Кроме того, ДНК-лигаза фага Т4 в отличие от ДНК-лигазы *E. coli* способна катализировать реакцию воссоединения двухцепочечных фрагментов ДНК с тупыми концами, т. е. фрагментов без перекрывающихся одноцепочечных комплементарных участков. Поэтому в настоящее время в генно-инженерных экспериментах предпочитают использовать ДНК-лигазу фага Т4, как более универсальный фермент.

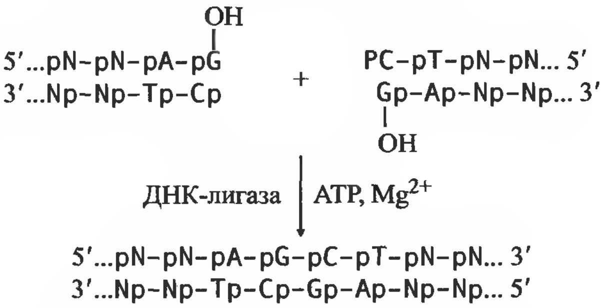
ДНК-лигаза фага Т4 является мономерным полипептидом с молекулярной массой 68 кДа и катализирует образование фосфодиэфирной связи между прилегающими 5′-фосфатным (5′-р) и 3′-гидроксильным (3′-ОН) концами цепей ДНК. При этом возможны два типа реакций.

1. Лигирование липких концов:



Субстраты этой реакции — двухцепочечные молекулы ДНК с одноцепочечными, полностью комплементарными липкими концами. Частным случаем такой реакции является лигирование так называемого ***ника*** (nick) — разрыва в одной из нитей двухцепочечной ДНК.

2. Лигирование тупых концов:



Таким образом, ДНК-лигаза фага Т4 обеспечивает ковалентное соединение любых двухцепочечных фрагментов ДНК, для которых имеется возможность состыковать 5′-р и 3′-ОН концы. Поэтому она является одним из важнейших ферментов, на использовании которых основаны современные методы рекомбинации молекул ДНК *in vitro*.

1.2.3. ДНК-полимераза I E. coli

ДНК-полимераза I *E. coli* была обнаружена А. Корнбергом с сотрудниками в 1958 г. Этот фермент явился первой найденной полимеразой. Он представляет собой мономерную полипептидную цепь с молекулярной массой 103 кДа и имеет трехдоменную структуру (рис. 1.12). Каждый домен белка обладает отдельной ферментативной активностью: N-концевой домен — 5′–3′-экзонуклеазной; С-концевой — 5′–3′-полимеразной; средний домен — 3′–5′-экзонуклеазной.

ДНК-полимераза I *E. coli* (PolI) не связывается с молекулами двухцепочечной кольцевой ДНК. Однако если такие молекулы денатурировать и получить одноцепочечные формы, то с ними полимераза связывается в количествах, пропорциональных длине этих участков, — примерно одна молекула на 300 нуклеотидных остатков. PolI связывается с одноцепочечными участками двойной спирали ДНК, в местах одноцепочечных разрывов, а также с концами двухцепочечных молекул ДНК.

Рассмотрим ферментативные активности ДНК-полимеразы I *E. coli*.

5′–3′-полимеразная активность. Для реакции необходимо наличие одноцепочечной ДНК-матрицы и комплементарного участку этой цепи фрагмента — ***праймера*** (затравки) с 3′-ОН концом:

```
OH 3′
 |
5′...pC–pC–pG                           dATP
3′...Gp–Gp–Cp–Tp–Ap–Tp–Cp–Gp... 5′  +   dCTP
                                        dGTP
                                        dTTP
          PolI | Mg2+
               ↓
5′...pC–pC–pG–pA–pT–pA–pG–pC... 3′
3′...Gp–Gp–Cp–Tp–Ap–Tp–Cp–Gp... 5′
```

3′–5′-экзонуклеазная активность. Одноцепочечная или двухцепочечная ДНК гидролизуется с 3′-ОН конца:

```
                            OH
                             |
5′...pC–pG–pC–pA–pT–pG–pT
3′...Gp–Cp–Gp
          PolI | Mg2+
               ↓
          OH
           |                  pA
5′...pC–pG–pC          +      pG
3′...Gp–Cp–Gp                 pT
```

Необходимо подчеркнуть, что 3′–5′-нуклеаза расщепляет диэфирную связь только в неспаренных участках ДНК.

При полимеразной реакции с определенной частотой возможно включение в растущую цепь некомплементарного нуклеотида. Однако полимераза не может присоединять нуклеотид к неправильно спаренному концу, образовавшемуся при ее участии. На помощь приходит 3′–5′-экзонуклеаза, убирающая ошибочный нуклеотид, на место которого затем присоединяется правильный. 3′–5′-экзонуклеолитическая активность проявляется в направлении, обратном синтезу ДНК (см. рис. 1.12).

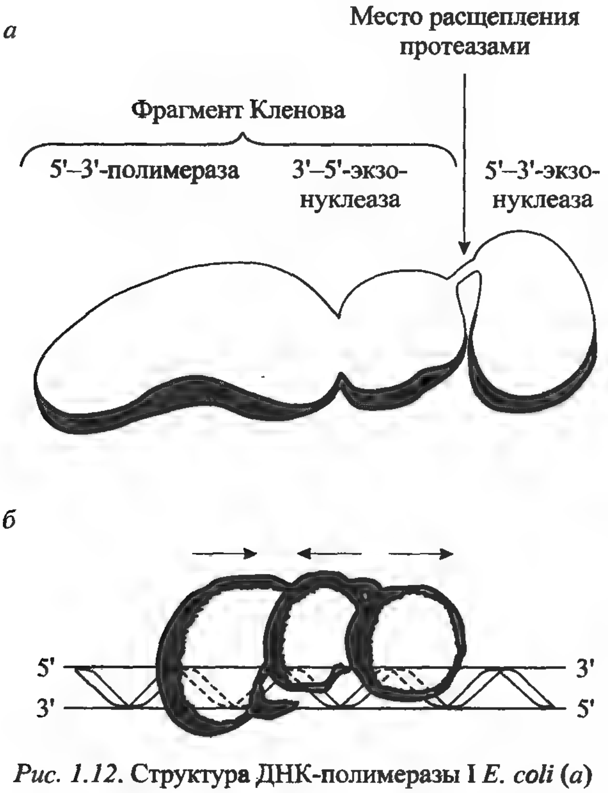


Рис. 1.12. Структура ДНК-полимеразы I *E. coli* (*а*) и модель ее взаимодействия с молекулой ДНК (*б*).

Стрелки указывают направление ферментативных реакций, катализируемых доменами полимеразы

Таким образом, 3′–5′-экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы играет важную роль в обеспечении точности полимеризации, направляемой матрицей. Эффективность, или число оборотов, данной экзонуклеазы в оптимальных условиях составляет 2 % от числа оборотов субъединицы с полимеразной активностью.

5′–3′-экзонуклеазная активность деградирует одну цепь двухцепочечной ДНК, начиная со свободного 5′-конца. В отличие от 3′–5′-экзонуклеазы 5′–3′-экзонуклеаза расщепляет диэфирную связь только в спаренных участках двухцепочечной молекулы ДНК. Более того, 3′–5′-нуклеаза отщепляет одномоментно только один нуклеотид, в то время как 5′–3′-нуклеаза может вырезать с 5′-конца олигонуклеотиды длиной до десяти остатков (около 20 % продуктов гидролиза):

```
   5′  pC–pG–pC–pA–pT–pC–pT... 3′
3′...Gp–Cp–Gp–Cp–Gp–Tp–Ap–Gp–Ap... 5′
          PolI | Mg2+
               ↓
               5′ pT–pC–pT... 3′
3′...Gp–Cp–Gp–Cp–Gp–Tp–Ap–Gp–Ap... 5′   +

                        +  pC, pG–pC–pA
```

Скорость нуклеазного отщепления увеличивается на порядок при одновременно протекающей реакции полимеризации. При этом возрастает относительное количество олигонуклеотидов в продуктах гидролиза ДНК. Благодаря такому сочетанию ферментативных активностей ДНК-полимераза I *E. coli* играет важную роль в репарации повреждений ДНК *in vivo*.

ДНК-полимераза I *E. coli* после связывания с двухцепочечной ДНК в месте одноцепочечного разрыва в присутствии необходимых дезоксинуклеозидтрифосфатов катализирует одновременно две реакции — 5′–3′-экзонуклеазный гидролиз разорванной цепи молекулы ДНК и 5′–3′-полимеразную реакцию. При этом происходит перенос одноцепочечного разрыва вдоль молекулы ДНК, который иначе называется ***ник-трансляцией***. Заменяя в реакции ник-

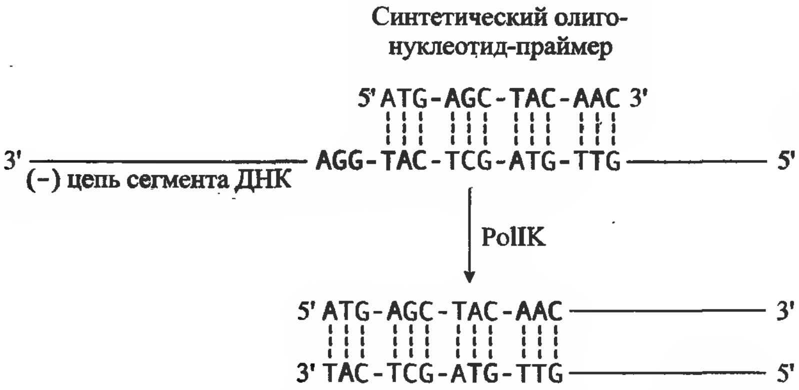


Рис. 1.13. Схема метода репарации, направляемой праймером

трансляции нуклеотиды, формирующие цепь ДНК, на радиоактивно меченные, можно получить меченую ДНК с высокой удельной активностью. Такой методический прием используют довольно часто. Ник в двухцепочечную ДНК обычно вводят, добавляя следовые количества дезоксирибонуклеазы I из поджелудочной железы быка. Данный фермент представляет собой эндонуклеазу. В присутствии ионов Mg^{2+} ДНКаза I воздействует независимо на каждую цепь ДНК, при этом места разрывов располагаются случайным образом.

N-концевой домен молекулы ДНК-полимеразы I *E. coli* соединен со следующим доменом петлей из аминокислотных остатков (см. рис. 1.12), которая наиболее доступна действию протеаз. Поэтому при ограниченном протеолизе фермента субтилизином, трипсином или другими протеазами он распадается на два фрагмента, имеющих размер 68 кДа и 35 кДа. Меньший фрагмент обладает 5′–3′-экзонуклеазной активностью, а больший — 5′–3′-полимеразной и 3′–5′-экзонуклеазной активностями. Последний бифункциональный фрагмент принято называть ***фрагментом Кленова ДНК-полимеразы* I *E. coli*** (по фамилии одного из описавших его авторов). Фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I (PolIK) можно выделить также из экстрактов *E. coli*. Происходит ли образование этого фрагмента в клетке или он формируется в процессе экстракции, пока не ясно.

PolIK обычно используют для достройки одноцепочечных 5′-концов на двухцепочечной ДНК, часто генерируемых рестриктазами, до тупых; для синтеза второй цепи на одноцепочечной ДНК; для гидролиза одноцепочечных 3′-концов на двухцепочечных молекулах ДНК.

Рассмотренные свойства фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* позволили Д. Гоедделу с соавторами предложить в 1980 г. метод репарации, направляемой праймером (primer repair technique). Суть данного подхода заключается в следующем. Если необходим гидролиз сегмента ДНК с известной последовательностью до строго определенной точки, например до инициаторного ATG-триплета структурного гена, то синтезируется олигонуклеотид-праймер, соответствующий началу этого гена. Затем осуществляют денатурацию сегмента молекулы ДНК, содержащего изучаемый ген, и отжиг в присутствии избытка синтезированного олигонуклеотида. При этом образуются дуплексы между праймером и комплементарной цепью используемого сегмента (рис. 1.13). В процессе обработки фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* одноцепочечный 3′-конец полученного дуплекса удаляется под действием 3′–5′-экзонуклеазной активности, а вторая цепь на 5′-конце достраивается с помощью 5′–3′-полимеразной активности фермента. Данный метод важен для выполнения тонких генно-инженерных манипуляций.

1.2.4. Обратная транскриптаза

При изучении ретровирусов, геном которых представлен молекулами одноцепочечной РНК, было обнаружено, что в процессе внутриклеточного развития они проходят стадию интеграции своего генома в виде двухцепочечной ДНК в хромосомы клетки-хозяина. В 1964 г. Х. Темин выдвинул гипотезу о существовании вирусспецифичного фермента, способного синтезировать на РНК-матрице комплементарную ДНК. В 1970 г. Х. Темин и С. Мизутани, а также независимо от них Д. Балтимор открыли такой фермент в препарате внеклеточных вирионов вируса саркомы Рауса. Данная РНК-зависимая ДНК-полимераза получила название ***ревертаза*** (обратная транскриптаза).

Наиболее детально изучена ревертаза ретровирусов птиц. Каждый вирион содержит около 50 молекул этого фермента. Обратная транс-

криптаза состоит из двух субъединиц — α (65 кДа) и β (95 кДа), присутствующих в эквимолярном количестве. α-Субъединица представляет собой N-концевую часть (две трети) β-субъединицы.

Обратная транскриптаза обладает по крайней мере тремя ферментативными активностями:

- ДНК-полимеразной, использующей в качестве матрицы как РНК, так и ДНК;
- активностью РНКазы Н, гидролизующей РНК в составе гибрида РНК–ДНК, но не одно- или двухцепочечную РНК;
- ДНК-эндонуклеазной.

Первые две активности необходимы для синтеза вирусной ДНК, а эндонуклеаза, по-видимому, важна для интеграции вирусной ДНК в геном клетки-хозяина. β-Субъединица ревертазы обладает всеми тремя активностями, в то время как α-субъединица — только полимеразной и РНКазы Н.

Очищенная обратная транскриптаза синтезирует ДНК как на РНК-, так и на ДНК-матрицах. Чтобы начать синтез, ревертазе, как и другим полимеразам, необходим короткий двухцепочечный участок — праймер. Праймером может служить одноцепочечный сегмент как РНК, так и ДНК, которые в процессе реакции оказываются ковалентно связанными с новосинтезированной цепью ДНК.

Обратную транскриптазу преимущественно используют для транскрипции матричной РНК

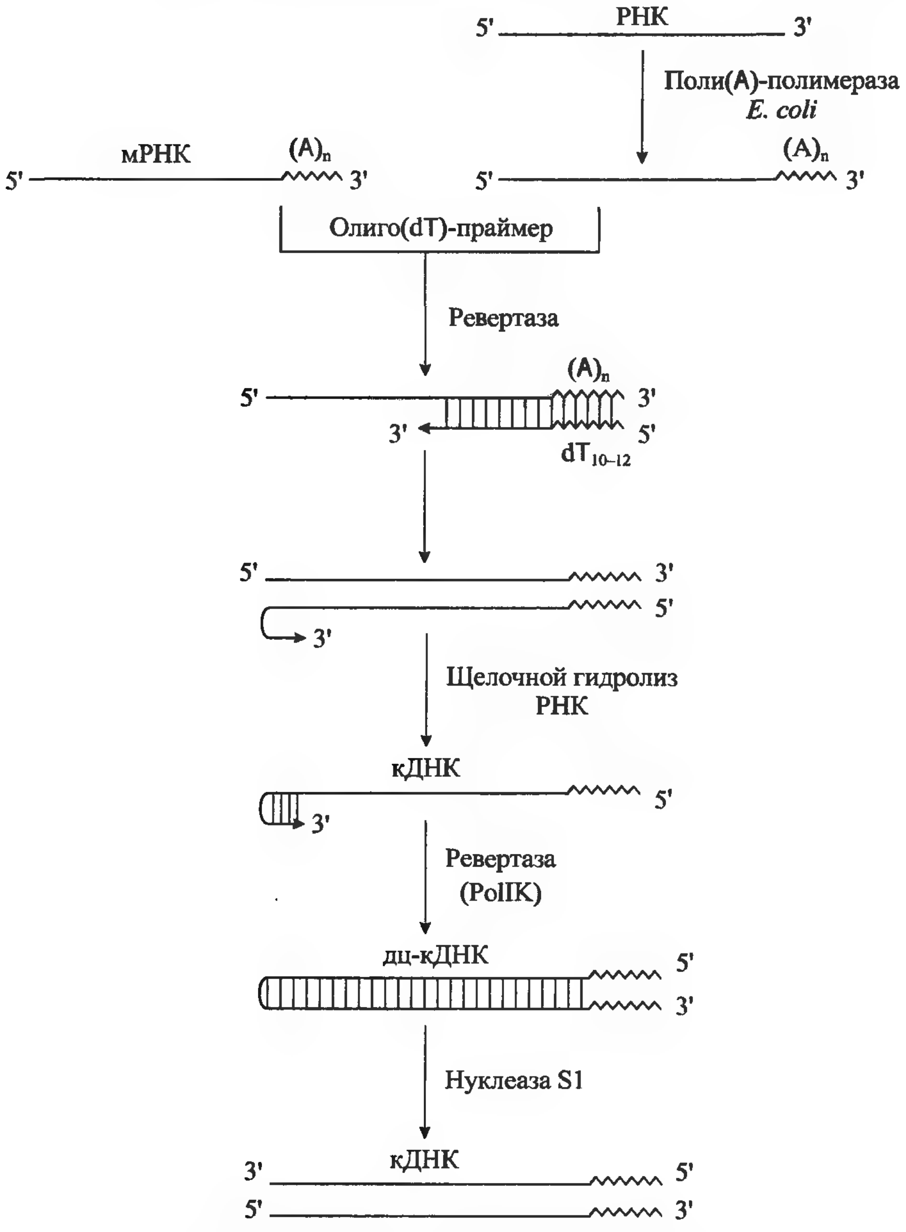


Рис. 1.14. Схема синтеза двухцепочечных ДНК-копий молекул РНК

в комплементарную ДНК (кДНК). Реакцию обратной транскрипции проводят в присутствии сильных ингибиторов РНКазной активности. При этом удается получать полноразмерные ДНК-копии целевых молекул РНК. В качестве праймера при обратной транскрипции поли(А)-содержащих мРНК используют олиго(dT) (рис. 1.14), а для молекул РНК, не имеющих 3′-поли(А)-концов, — химически синтезированные олигонуклеотиды, комплементарные 3′-концу изучаемой РНК. Кроме того, последний тип молекул РНК можно перевести в поли(А)-содержащие с помощью поли(А)-полимеразы *E. coli*.

После синтеза на мРНК комплементарной цепи ДНК и разрушения РНК (обычно применяют обработку щелочью) осуществляют синтез второй цепи ДНК. При этом используют способность ревертазы образовывать на 3′-концах одноцепочечных кДНК самокомплементарные шпильки, которые могут выполнять функции праймера. Матрицей служит первая цепь кДНК. Данная реакция может катализироваться как ревертазой, так и ДНК-полимеразой I *E. coli*. Сочетание этих двух ферментов позволяет повысить выход полноценных двухцепочечных молекул кДНК.

По окончании синтеза первая и вторая цепи кДНК остаются ковалентно связанными петлей шпильки, служившей праймером при синтезе второй цепи. Эту петлю расщепляют ***эндонуклеазой S1***, специфически разрушающей одноцепочечные участки нуклеиновых кислот. Образующиеся при этом концы не всегда оказываются тупыми, и для повышения эффективности последующего клонирования их репарируют до тупых с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*. Полученную двухцепочечную кДНК можно затем встраивать в клонирующие векторы, размножать в составе гибридных молекул ДНК и использовать для дальнейших исследований.

1.2.5. Нуклеаза Bal31

В 1975 г. Х. Грэй с соавторами, изучая внеклеточные нуклеазы *Alteromonas espejiana* Bal31, обнаружили фермент, который функционирует: 1) как экзонуклеаза, катализирующая удаление малых олигонуклеотидов или мононуклеотидов одновременно с 5′- и 3′-концов двухцепочечной ДНК, причем обе цепи ДНК деградируют примерно с одинаковой скоростью; 2) как эндонуклеаза, специфичная к одноцепочечной ДНК. Данный фермент получил название нуклеаза Bal31.

Способность нуклеазы Bal31 вызывать деградацию с концов одновременно обеих цепей молекулы ДНК привлекла к этому ферменту внимание исследователей. Оказалось, что образовавшиеся после обработки Bal31 фрагменты ДНК можно сшить с помощью ДНК-лигазы фага Т4 с другими молекулами ДНК, имеющими тупые концы. Эффективность лигирования существенно повышается, если укороченные с помощью Bal31 молекулы ДНК обработать фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*. Это указывает на то, что в результате гидролиза нуклеазой Bal31 образуются фрагменты ДНК как с тупыми, так и с одноцепочечными концами.

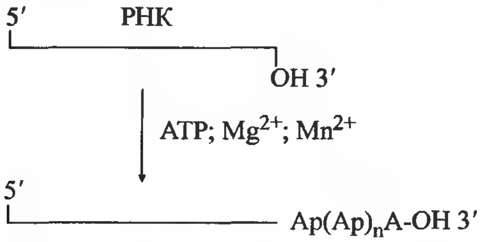
В определенных условиях линейную двухцепочечную ДНК можно контролируемо гидролизовать с обоих концов нуклеазой Bal31, что используется при конструировании гибридных молекул ДНК, когда необходимо в их составе сблизить какие-либо функционально значимые генетические элементы.

1.2.6. Концевая дезоксинуклеотидилтрансфераза

В 1962 г. Ф. Боллум обнаружил в тимусе теленка необычный фермент, названный концевой дезоксинуклеотидилтрансферазой, или ***терминальной трансферазой***. Данный фермент катализирует последовательное присоединение дезоксинуклеотидов к 3′-ОН-концу молекулы ДНК. Субстратом терминальной трансферазы при использовании в качестве кофактора ионов Mg^{2+} является одноцепочечная ДНК с 3′-ОН-концом или двухцепочечная ДНК с выступающим одноцепочечным 3′-ОН-концом. При использовании в качестве кофактора ионов Co^{2+} этот фермент может катализировать присоединение дезоксинуклеотидов к 3′-ОН концу двухцепочечной ДНК с тупыми концами или даже к 3′-ОН-концу двухцепочечной ДНК с выступающим одноцепочечным 5′-р-концом. При введении в реакцию, направляемую терминальной трансферазой, лишь одного типа дезоксинуклеотидов образуются молекулы ДНК, имеющие гомополимерные одноцепочечные 3′-концы. Таким же образом можно достроить другим молекулам ДНК гомополимерные 3′-концы, комплементарные первым. Смешение полученных препаратов ДНК при определенных условиях может приводить к формированию гибридных молекул ДНК. Именно с помощью концевой дезоксинуклеотидилтрансферазы в 1972 г. был выполнен первый эксперимент по рекомбинации молекул ДНК *in vitro*.

1.2.7. Поли(А)-полимераза E. coli

Данный фермент, открытый А. Сиппелом в 1973 г., катализирует присоединение к свободному 3′-ОН-концу одноцепочечных молекул РНК поли(А)-последовательностей:



Поли(А)-полимераза находит применение при подготовке молекул РНК к копированию с них комплементарных ДНК (см. рис. 1.14). Этот фермент можно использовать и для введения радиоактивной метки в 3′-конец РНК.

Кроме рассмотренных выше, в экспериментах по клонированию фрагментов ДНК и анализу структуры гибридных ДНК используют большой набор других ферментов нуклеинового обмена. К ним относятся полинуклеотидкиназа, щелочная фосфатаза, 5′-экзонуклеаза фага λ, экзонуклеаза III *E. coli*, рибонуклеазы, метилазы и др.

Все используемые при конструировании гибридных молекул ДНК ферменты должны быть высокоочищенными, так как даже незначительные посторонние нуклеазные загрязнения могут приводить к побочным реакциям и резко снижать эффективность получения целевых генетических конструкций. Поэтому изучение ферментов, разработка методов их глубокой очистки, а также поиск новых ферментов, специфически действующих на нуклеиновые кислоты, активно продолжаются. Важной областью исследований, которой не всегда уделяется должное внимание, является оптимизация условий культивирования микроорганизмов — продуцентов ферментов нуклеинового обмена. В ряде лабораторий показано, что, оптимизируя параметры процесса культивирования путем применения методов математического планирования эксперимента, можно повысить удельный выход этих ферментов в десятки раз.

В совокупности многочисленные ферменты, имеющие в качестве субстрата катализируемых ими реакций нуклеиновые кислоты, составляют биохимическую базу экспериментов по конструированию *in vitro* и анализу гибридных молекул ДНК.

1.3. МЕТОДЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ ГИБРИДНЫХ МОЛЕКУЛ ДНК *IN VITRO*

1.3.1. Коннекторный метод

В 1972 г. П. Берг с сотрудниками впервые сообщили о получении *in vitro* гибридной молекулы, состоящей из ДНК вируса SV40 и ДНК фага λdv*gal*. При этом использовался метод, получивший название коннекторного. Принцип одного из вариантов этого метода заключается в следующем. К 3′-концам одного из рекомбинируемых *in vitro* фрагментов ДНК с помощью концевой дезоксинуклеотидилтрансферазы достраивают одноцепочечные олиго(dA)-сегменты определенной длины (рис. 1.15), а к концам другого фрагмента — олиго(dT)-сегменты примерно такой же длины. При смешении полученных таким образом фрагментов формируются кольцевые структуры за счет водородных связей между олиго(dA)- и олиго(dT)-последовательностями. Одноцепочечные бреши гибридных молекул ДНК застраивают с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli* и цепи ковалентно сшивают в лигазной реакции.

Коннекторным методом удается рекомбинировать *in vitro* фрагменты ДНК, полученные любым из способов расщепления исходной ДНК (механическим, ферментативным). При этом используют синтетические комплементарные олиго(dA)·олиго(dT)- или олиго(dG)·олиго(dC)-концы. Поскольку можно формировать достаточно длинные взаимокомплементарные одноцепочечные концы, гибридные молекулы образуются с высокой эффективностью. В частности, поэтому при клонировании ДНК-копий матричных РНК, которые доступны в ограниченных количествах, обычно используют коннекторный метод.

Однако этот метод имеет недостатки. Часто выделение встроенного фрагмента из гибридной молекулы ДНК затруднено. В ряде случаев удается подобрать условия для избирательной денатурации олиго(dA·dT)-последовательностей, по которым состыкованы фрагменты ДНК, и расщепить образовавшиеся одноцепочечные участки эндонуклеазой S1. При рекомбинации *in vitro* фрагментов ДНК, генерированных рестриктазой *Pst*I, с использованием синтетических олиго-(dG)·олиго(dC)-концов участок узнавания этой рестриктазы восстанавливается (рис. 1.16) и встроенный фрагмент можно уже достаточно просто выщепить из гибридной молекулы с помощью рестриктазы *Pst*I. Однако кроме целевой последовательности данный фрагмент имеет дополнительные концевые сегменты олиго(dG·dC).

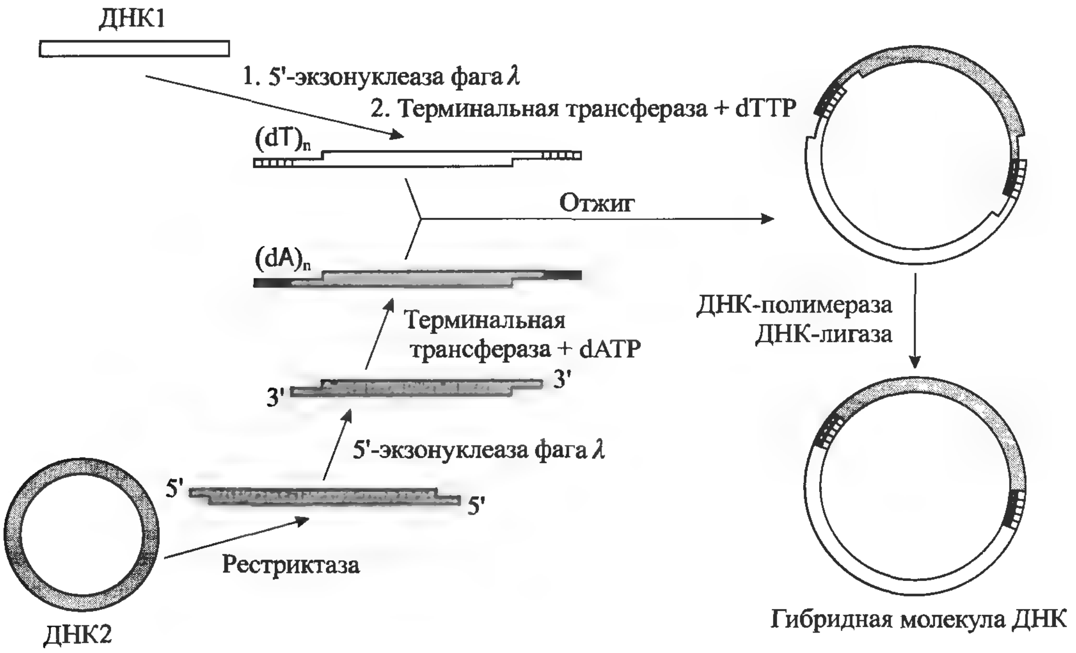


Рис. 1.15. Схема коннекторного метода

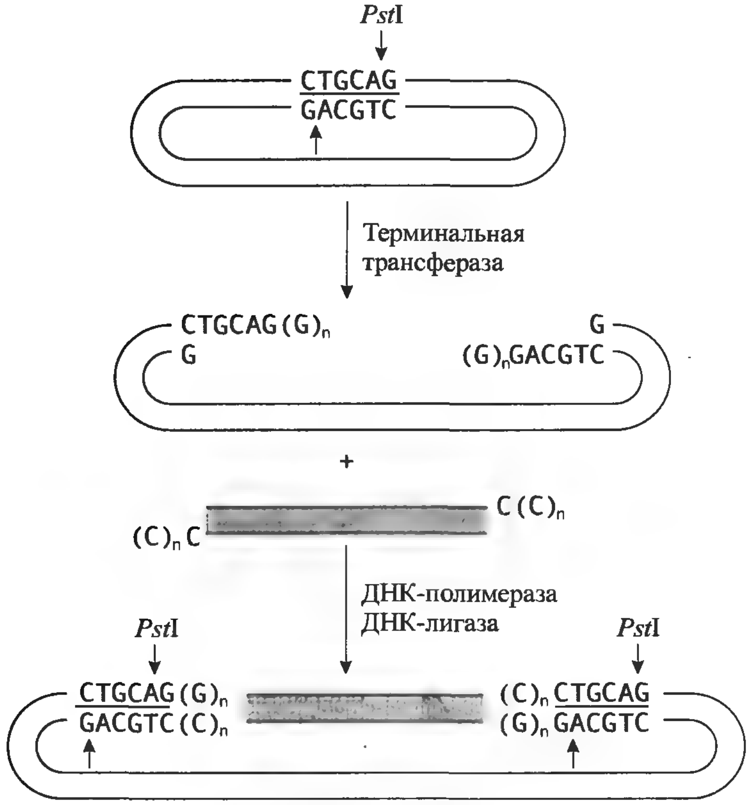


Рис. 1.16. Схема клонирования коннекторным методом фрагментов ДНК по *Pst*I-участку векторной молекулы

1.3.2. Рестриктазно-лигазный метод

Более простой и самый популярный метод получения *in vitro* гибридных молекул ДНК — рестриктазно-лигазный. Первые гибридные молекулы ДНК получили этим методом С. Коэн с сотрудниками в 1973 г.

Данный метод состоит в следующем (рис. 1.17):

1) рестриктазой класса II специфически разрезают молекулы ДНК на фрагменты, имеющие идентичные взаимокомплементарные липкие концы;

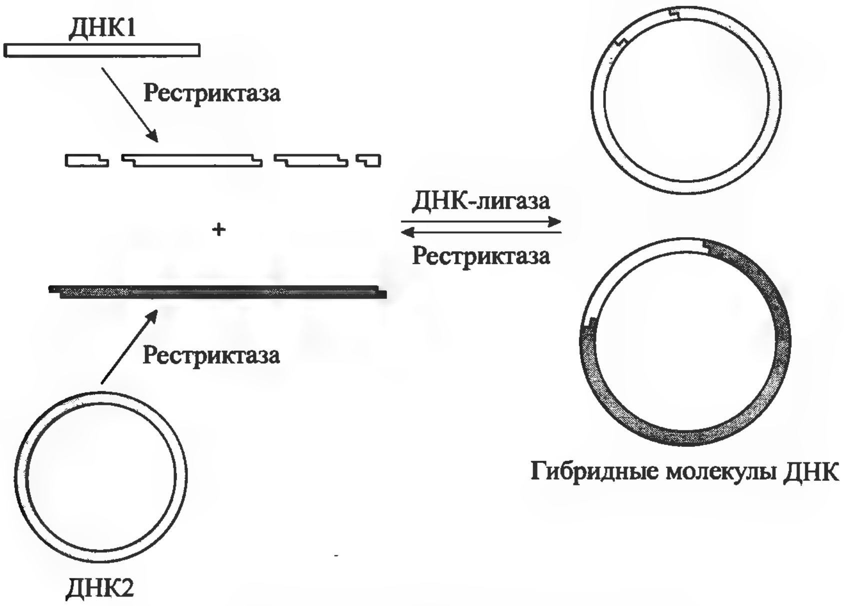


Рис. 1.17. Схема рестриктазно-лигазного метода

2) препараты различных молекул ДНК, гидролизованных одной и той же рестриктазой, смешивают, и при определенных условиях липкие концы разных фрагментов ДНК реассоциируют за счет комплементарного взаимодействия;

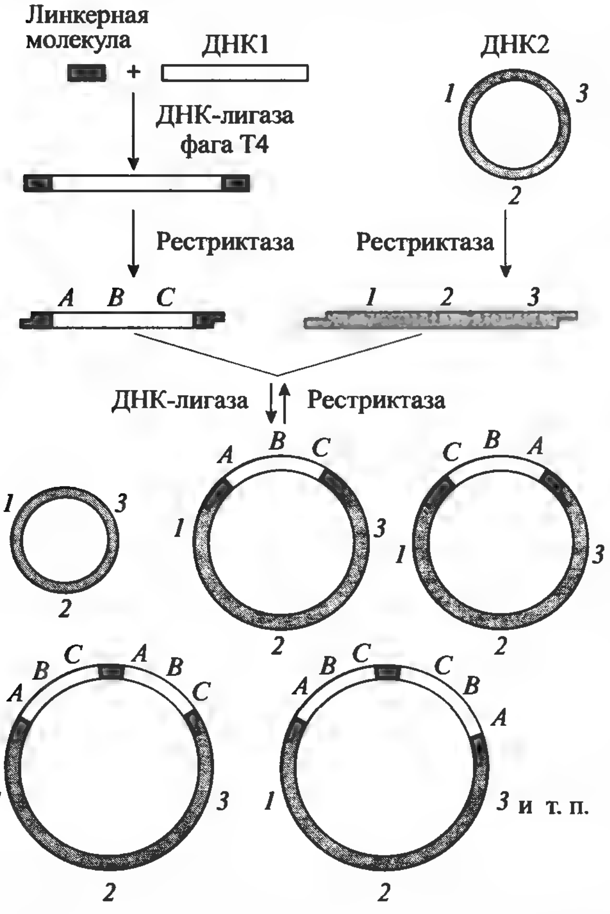


Рис. 1.18. Схема использования линкерных молекул для конструирования гибридных ДНК

3) с помощью ДНК-лигазы происходит ковалентное связывание ассоциированных фрагментов ДНК.

По такой схеме могут быть ковалентно соединены *in vitro* два и более любых фрагмента, полученных при гидролизе молекул ДНК одной и той же рестриктазой. Однако с помощью рестриктаз (особенно одного фермента) в каждом конкретном случае можно получить лишь специфический, строго определенный набор фрагментов изучаемой ДНК. Первоначально это в некоторой степени ограничивало применение рестриктазно-лигазного метода. Но затем получила распространение новая его модификация, основанная на использовании ***линкерных молекул*** — синтетических сегментов ДНК, содержащих в своем составе последовательности, узнаваемые рестриктазами. Метод предложили Р. Шеллер с сотрудниками в 1977 г. Он позволяет достаточно просто рекомбинировать *in vitro* практически любые фрагменты ДНК.

Разработанный подход включает следущие операции (рис. 1.18):

1) по тупым или липким концам фрагмента ДНК, который предполагается рекомбинировать, с помощью лигазы фага Т4 пришивают короткие синтетические двухцепочечные сегменты, имеющие участки узнавания определенной рестриктазы;

2) полученный фрагмент обрабатывают выбранной рестриктазой, в результате чего образуются липкие концы;

3) полученный фрагмент рекомбинируют *in vitro* с другими молекулами ДНК по обычной схеме рестриктазно-лигазного метода.

Использование линкерных молекул делает рестриктазно-лигазный метод рекомбинации фрагментов ДНК *in vitro* универсальным, поскольку исходные фрагменты можно получать самыми различными способами.

Рестриктазно-лигазный метод, по сравнению с коннекторным методом, находит более широкое применение в генно-инженерных манипуляциях, поскольку он более прост биохимически и, кроме того, дает возможность легко выщепить встроенный фрагмент из гибридной молекулы ДНК, что часто бывает важно при переносе фрагмента в другое генетическое окружение.

Данный метод не ограничивается использованием в каждом конкретном эксперименте лишь одной рестриктазы. Комбинируемые молекулы ДНК могут иметь разные липкие концы, генерируемые двумя рестриктазами. В этом случае фрагменты объединяются в строго определенной ориентации относительно друг друга (например, см. рис. 2.5, 2.10). При смешении же фрагментов, полученных после гидролиза одной рестриктазой, возможны различные их ориентации в формирующихся гибридных молекулах ДНК. Более того, в процессе лигазной реакции может происходить ковалентное объединение не только двух, но и трех, а также большего числа фрагментов (см. рис. 1.18).

Процедуры клонирования целевых фрагментов ДНК значительно упростились с развитием метода амплификации сегментов ДНК в полимеразной цепной реакции.

Спектр продуктов лигазной реакции зависит от концентрации участвующих в ней фрагментов ДНК (рис. 1.19). При высокой концентрации преимущественно будут формироваться линейные длинные молекулы ДНК. По мере снижения концентрации фрагментов повыша-

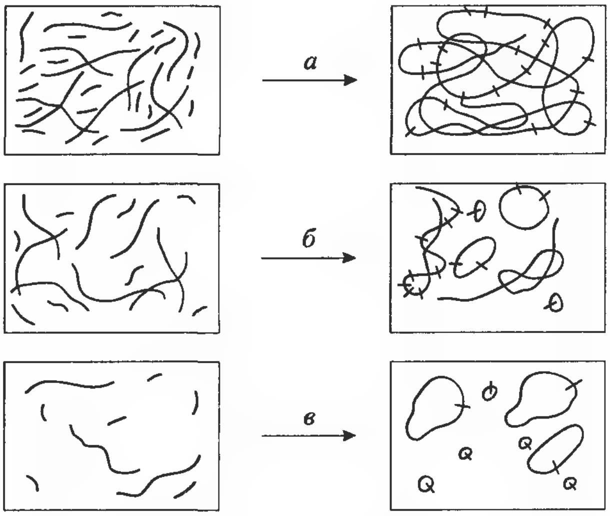


Рис. 1.19. Влияние концентрации фрагментов ДНК на спектр продуктов лигазной реакции:

а — высокая, *б* — средняя,
в — низкая концентрация фрагментов ДНК

ется вероятность образования кольцевых молекул ДНК. Гибридные молекулы с наибольшей частотой будут состоять из двух фрагментов, реже из трех и более. Если препарат развести до определенной концентрации (так, что вероятность встречи фрагментов друг с другом в растворе будет мала), то преимущественно будут образовываться гомокольца.

После каждой лигазной реакции образуется смесь разнообразных гибридных молекул ДНК, из которой целевые молекулы с заданной структурой отбирают на стадии введения в клетки и размножения гибридов, а также на стадии селекции и/или анализа гибридных клонов на предмет искомой генетической конструкции.

При использовании комбинации этих методов можно успешно отбирать гибридные молекулы ДНК, составляющие лишь малую часть полученного после лигазной реакции препарата.

1.4. ВЕКТОРНЫЕ МОЛЕКУЛЫ ДНК

Рассмотренные в предыдущем разделе методы позволяют достаточно легко осуществлять рекомбинацию *in vitro* любых фрагментов ДНК. Если один из этих фрагментов в составе гибридных молекул ДНК которая содержит информацию, необходимую для автономной репликации в определенном типе клеток, то другие фрагменты ДНК, ковалентно соединенные с первым, можно амплифицировать (размножить) в этих клетках. При выделении чистой культуры из колонии (или вирусной бляшки), выросшей из единичной клетки, которая содержит индивидуальную молекулу гибридной ДНК, осуществляется клонирование определенного фрагмента ДНК. При этом фрагмент, обеспечивающий репликацию гибридной молекулы ДНК в клетке, называется ***клонирующим вектором***. Такой вектор должен обладать следующими основными свойствами:

- иметь ограниченное (предпочтительно одно) число мест расщепления определенной рестриктазой;
- содержать генетический маркер, который может быть использован для отбора клонов, несущих гибридные ДНК, после введения в чувствительные клетки смеси молекул

- ДНК, полученных в процессе рекомбинации *in vitro*;
- не должен терять репликативные функции при встройке экзогенного фрагмента ДНК.

В качестве векторных молекул в генетической инженерии используют широкий спектр плазмидных и вирусных ДНК. Наиболее популярны клонирующие векторы, несущие несколько генетических маркеров, по которым можно легко отличить исходную векторную ДНК от получаемых гибридов, и имеющие по одному месту действия для нескольких рестриктаз. Кроме того, обычно желательно, чтобы вектор обеспечивал эффективную репликацию гибридных ДНК, так как часто важно иметь в клетке повышенное число копий клонированных генов.

Частным случаем клонирующих векторов являются ***экспрессирующие векторы***. Это молекулярные векторы, которые наряду с амплификацией обеспечивают правильную и эффективную экспрессию чужеродных генов в клетках-реципиентах.

В ряде случаев молекулярные векторы могут обеспечивать интеграцию чужеродной ДНК в геном клетки или вируса. Такие молекулы ДНК называют ***интегративными векторами***.

Векторные молекулы играют важнейшую роль на этапе клонирования *in vivo* изучаемых последовательностей ДНК. Конкретные векторы будут рассмотрены в дальнейшем для каждой генно-инженерной системы отдельно. Использование клонирующих векторов позволяет получать необходимый фрагмент ДНК в индивидуальном состоянии и в препаративных количествах. Это подняло на качественно новый уровень исследования структурно-функциональной организации геномов как прокариотических, так и эукариотических организмов (см. 1.7). Разработка и совершенствование экспрессирующих векторов позволяет все с большей определенностью создавать штаммы — суперпродуценты чужеродных белков.

1.5. ВВЕДЕНИЕ МОЛЕКУЛ ДНК В КЛЕТКИ

Необходимый этап генно-инженерного эксперимента — введение полученных *in vitro* гибридных молекул ДНК в ***пермиссивные клетки*** (обеспечивающие репликацию этих молекул) с целью размножения, селекции и выделения клонов гибридов.

Введение в клетку нуклеиновой кислоты вируса с последующим образованием вирусного потомства называется ***трансфекцией***. Эффективность трансфекции выражается обычно количеством инфекционных центров (бляшек, негативных колоний), приходящихся на молекулу или на единицу массы нуклеиновой кислоты вируса. Вирусные клоны, полученные после трансфекции из отдельных бляшек, называют ***трансфектантами***. Следует отметить, что нуклеиновые кислоты некоторых типов вирусов неинфекционны, т. е. неактивны в тесте трансфекции. Это обусловлено тем, что для инициации экспрессии генома данных вирусов необходимы определенные вирусспецифические белки, содержащиеся в вирусных частицах, но отсутствующие в препарате очищенной нуклеиновой кислоты.

Процесс, в результате которого экзогенная ДНК проникает в реципиентную клетку и вызывает у нее наследуемые изменения, называют ***трансформацией***. Трансформацию клеток могут осуществлять как молекулы ДНК, реплицирующиеся в клетках внехромосомно (плазмиды), так и молекулы ДНК, интегрирующиеся в геном клетки (линейные и кольцевые молекулы ДНК). Генетически трансформированные клетки принято называть ***трансформантами***. Эффективность трансформации обычно выражают количеством клонов (колоний, образованных в результате делений исходно единичной клетки) трансформантов, приходящихся на молекулу или единицу массы донорной ДНК. Данную генетическую (биохимическую) трансформацию необходимо отличать от онкогенной трансформации эукариотических клеток.

Физиологическое состояние клетки, в котором она способна поглощать нуклеиновую кислоту из окружающей среды, называется ***компетентностью***. Однако многие бактерии, а также дрожжи и культивируемые клетки животных и растений такой физиологической компетентностью не обладают. Поэтому восприимчивость к экзогенной ДНК у них индуцируют различными способами. Такую компетентность принято называть индуцированной. Наиболее просто она достигается путем определенного химического или физического воздействия на клетки. Разные типы клеток имеют свои особенности строения клеточных стенок и плазматических мембран, поэтому они могут различаться по способам индукции у них компетентного состояния.

Исторически первым подходом к получению компетентных для трансфекции (трансформации) клеток бактерий является ферментативный гидролиз клеточных стенок, приводящий к удалению физического барьера на пути проникновения молекул ДНК в клетку. Для этой цели можно использовать различные индивидуальные ферменты (например лизоцим) или смеси ферментов (например пищеварительный сок виноградной улитки). При ферментативной обработке клетки необходимо помещать в изотонический раствор (0,2 М сахароза; 1 М сорбит; 0,6 М KCl и др.), имеющий примерно такое же осмотическое давление, какое характерно для цитоплазмы клетки. В этих условиях клетки, лишенные своего жесткого «панциря» (клеточной стенки), приобретают шарообразную форму и не лопаются от осмотического шока, наблюдаемого в гипотонической среде.

В том случае, когда после гидролиза полностью удаляется клеточная стенка и остается только плазматическая мембрана, ограничивающая содержимое клетки, возникает осмотически чувствительный ***протопласт***. Если после ферментативного гидролиза на плазматической мембране остаются фрагменты клеточной стенки или сохраняется внешняя мембрана (что характерно для грамотрицательных бактерий), то такие клетки называют ***сферопластами***. Как и протопласты, они являются осмотически чувствительными и в изотоническом растворе имеют форму шара.

При получении протопластов и сферопластов большое значение имеет подбор условий, обеспечивающих в последующем эффективную регенерацию клеточных стенок. Процедуры получения протопластов и сферопластов, трансформации их молекулами ДНК, регенерации клеточной стенки и отбора колоний трансформантов многоэтапны, а результат зависит от многих параметров: состава растворов, способов обработки и др. Все это приводит к тому, что данные методики отличаются низкой воспроизводимостью, требуют высокой квалификации исполнителя и весьма трудоемки. Поэтому по мере разработки более простых способов данный подход постепенно утратил свое значение. На смену пришли методы обработки клеток растворами солей (см. 2.1).

В 1982 г. Т. Вонг и Е. Нейман с сотрудниками для введения молекул ДНК в культивируемые клетки мыши применили метод, получивший название ***электропорация***. В последующие годы метод был усовершенствован, что позволило использовать его эффективно как для эукариотических, так и для прокариотических клеток. Суть данного подхода состоит в том, что кратковременное воздействие (обычно 5–20 мс) электрического поля высокой напряженности (1–15 кВ/см) на клеточную мембрану приводит к образованию в ней пор (электропробой). Время существования и размер пор достаточны, чтобы такие макромолекулы, как ДНК, могли из внешней среды войти в клетку в результате действия осмотических сил. Объем клетки при этом увеличивается. Напряженность электрического поля и продолжительность его действия, концентрации трансформирующей ДНК и клеток-реципиентов для каждой системы клеток подбирают экспериментально, с тем чтобы добиться высокой частоты поглощения ДНК выжившими клетками. Показано, что в оптимальных условиях электропорации количество трансформантов может достигать 80 % выживших клеток.

Электропорация — физический, а не химический метод, и это, по-видимому, обусловливает его широкое применение. Электропорация может успешно использоваться для введения молекул ДНК в разные типы клеток, такие как культивируемые клетки животных, простейшие, дрожжи, бактерии и протопласты растений.

Электропорирующий эффект высоковольтного разряда на бислойную липидную мембрану, по-видимому, зависит от радиуса ее кривизны. Поэтому для эффективного поглощения ДНК мелким бактериальным клеткам требуется значительно бóльшая напряженность электрического поля (10 кВ/см и более), чем крупным животным и растительным клеткам (1–2 кВ/см).

Электропорация — наиболее простой, эффективный и воспроизводимый метод введения молекул ДНК в клетки. Однако до недавнего времени он использовался в ограниченном числе лабораторий в связи с отсутствием серийных приборов — электропораторов. Появление и совершенствование таких приборов привело к широкому применению данного метода в генетической инженерии самых разных типов клеток.

Разработка простых, эффективных и воспроизводимых методов введения экзогенных молекул ДНК в нативной форме в пермиссивные клетки является необходимым условием успешного развития работ по клонированию чужеродной генетической информации в клетках любого типа. Поэтому данному направлению исследований уделяется пристальное внимание и оно постоянно развивается.

1.6. МЕТОДЫ ОТБОРА ГИБРИДНЫХ КЛОНОВ

Смесь молекул, полученных после встройки в выбранный молекулярный вектор фрагментов экзогенной ДНК, вводят в компетентные клетки. Если при этом в вектор статистически встраивают большой набор разных фрагментов донорной ДНК, то вероятность встройки каждого конкретного фрагмента невелика. В этом случае необходимо иметь методы, позволяющие в большом многообразии получаемых гибридных клонов выявлять необходимые. В связи с этим в генно-инженерном эксперименте большое значение имеют методы скрининга (отбора) клонов, содержащих целевые гибридные ДНК.

1.6.1. Фенотипическая селекция

Первичный отбор гибридных клонов значительно упрощается, если в векторной молекуле предусмотрена специальная фенотипическая система селекции. При трансформации клеток чаще всего используют векторные молекулы ДНК, несущие гены устойчивости к антибиотикам и антиметаболитам. Поэтому на среде с определенным антибиотиком или антиметаболитом будут расти только клетки трансформантов. Особенно хорошо данная система селекции отработана для бактерий, так как получены векторные плазмиды, детерминирующие устойчивость трансформированных клеток сразу к нескольким антибиотикам. Если векторная плазмида определяет устойчивость к двум антибиотикам и при встройке в нее экзогенного фрагмента ДНК нарушается одна из генетических детерминант устойчивости к антибиотикам, то клоны клеток, содержащих такие гибридные ДНК, легко отличить от трансформантов, включающих исходный вектор, на средах с каждым антибиотиком в отдельности.

Например, если векторная плазмида детерминирует устойчивость одновременно к тетрациклину и ампициллину (Tc^rAp^r) и при встройке в нее чужеродного фрагмента нарушается ген устойчивости к ампициллину, то гибридная плазмида будет обусловливать фенотип клетки-хозяина Tc^rAp^s, т. е. устойчивость к тетрациклину и чувствительность к ампициллину. Плазмиды после встройки в них фрагментов ДНК вводят в клетки, культуру высевают на чашки с агаризованной питательной средой, в которую добавлен тетрациклин. При этом вырастают колонии клеток, содержащих или исходную векторную плазмиду, или гибридные плазмиды. Затем колонии перепечатывают на чашки с ампициллином и чашки с тетрациклином. Те колонии, которые после перепечатки будут расти на среде с тетрациклином и не дадут роста на среде с ампициллином, содержат гибридные плазмиды. Простота манипуляций обусловила широкое использование данного типа векторов для клонирования самых различных фрагментов ДНК. Однако такие плазмиды не позволяют осуществлять прямой отбор гибридных клонов — сразу после высева трансформантов на селективную среду и появления колоний.

В последние годы получен ряд векторных плазмид, предназначенных для прямой селекции трансформантов, содержащих гибридные плазмиды (см. 2.2.8). Такие векторы обычно имеют гены, потенциально летальные для чувствительных клеток-реципиентов, и могут трансформировать эти клетки только после инактивации данных генов встраиванием в них фрагментов ДНК.

Внедрение экзогенных фрагментов в состав ДНК вирусов обычно приводит к повреждению определенных вирусных генов, а часто (в силу ограничений, налагаемых на размер вирусного генома) возможно лишь при выщеплении сегмента вирусной ДНК. Поэтому гибридные вирусы, как правило, являются мутантными. Обычно используют такие варианты клонирования, при которых формируемый мутантный вирус жизнеспособен (в противном случае приходится использовать вирус-помощник, что усложняет работу). Мутантные вирусы часто удается отличить от исходного векторного, и это позволяет достаточно просто выявлять гибридные вирусы (см. 2.2.2).

1.6.2. Гибридизация нуклеиновых кислот in situ

Основной недостаток методов фенотипического выявления гибридных клонов плазмид и вирусов заключается в том, что с их помощью не удается отобрать гибриды, содержащие специфические последовательности ДНК. Последние можно легко выявить методами гибридизации нуклеиновых кислот *in situ* в колониях трансформированных клеток или в бляшках вирусов. Эти процедуры начиная с 1975 г. интенсивно совершенствовались, и в настоящее время они достаточно просты и активно используются в работах по клонированию генов.

Для примера рассмотрим схему гибридизации нуклеиновых кислот в колониях *Escherichia coli* (рис. 1.20). Колонии бактерий, вырос-

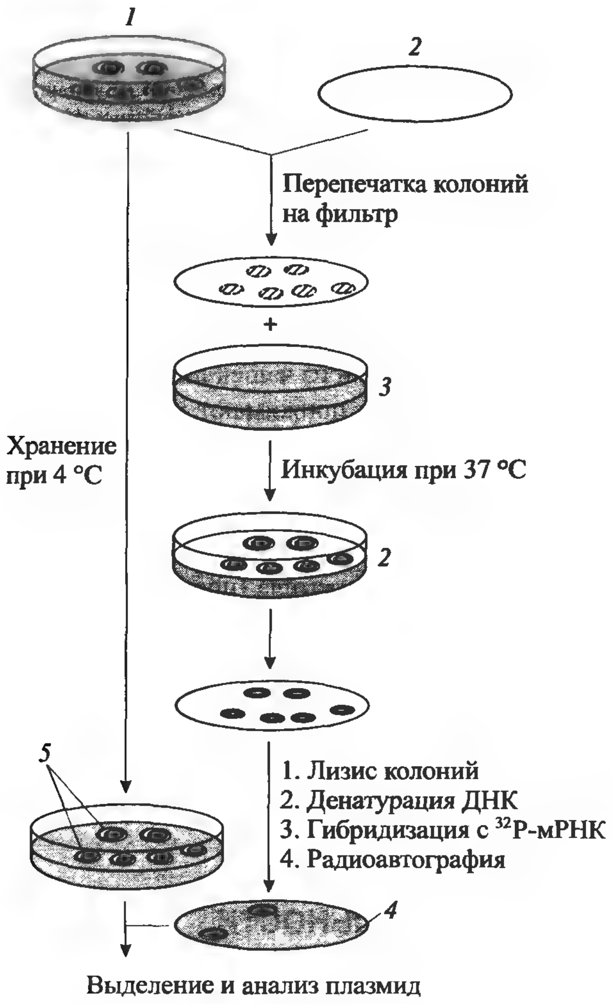


Рис. 1.20. Схема метода гибридизации нуклеиновых кислот *in situ*:

1 — матричная чашка; *2* — нитроцеллюлозный фильтр; *3* — чашка с агаризованной питательной средой; *4* — рентгеновская пленка; *5* — отобранные клоны

шие после трансформации их плазмидной ДНК, перепечатывают на нитроцеллюлозный фильтр, который помещают в чашку на агаризованную питательную среду и инкубируют до появления на нем колоний клеток. Расположение колоний на фильтре соответствует их расположению на матричных чашках. Клетки в колониях на фильтре лизируют в условиях, вызывающих денатурацию ДНК. Затем на обработанных фильтрах проводят гибридизацию адсорбировавшейся ДНК исследуемых клонов с радиоактивно высокомеченным препаратом целевой ДНК (или РНК) в условиях, благоприятных для образования комплементарных комплексов. Клоны, в которых произошла гибридизация нуклеиновых кислот, обнаруживаются радиоавтографически. Соответствующие бактериальные клоны с матричных чашек переносят в питательную среду и наращивают. Часть выросшей культуры каждого клона помещают на хранение в глицерине при температуре –70 °С, а из остальной части выделяют плазмидную ДНК и подвергают ее необходимому анализу.

1.6.3. Функциональная комплементация

Большой интерес для генетической инженерии представляет достижение правильной экспрессии клонированной генетической информации в клетках-реципиентах. Экспрессию легко выявить, если клонируемый ген при правильной транскрипции и трансляции обеспечивает функциональную комплементацию мутаций генома клетки. В этом случае нужный гибрид может быть обнаружен простым отбором трансформированных клонов на селективной среде. Например, в одной из первых работ такого типа, выполненной в 1976 г. в лаборатории Р. Дэвиса, выяснилось, что гибридная ДНК, полученная при встройке определенных фрагментов хромосомной ДНК дрожжей-сахаромицетов в ДНК векторного фага λ, комплементирует мутацию *E. coli* *his*B. Клоны, содержащие такие гибриды, отбирали по способности клеток расти на питательной среде без гистидина. В дальнейшем данный подход неоднократно использовался при попытке клонировать чужеродные гены.

1.6.4. Радиоиммуноанализ белков in situ

Одним из приоритетных направлений генно-инженерных исследований является достижение правильной экспрессии генов высших эукариот и их вирусов в бактериальных клетках. Однако в данных случаях экспрессию многих клонированных генов уже нельзя выявить по функциональной комплементации в силу некоторых принципиальных различий в организации прокариотических и эукариотических клеток. Несомненно, такой подход неприменим и при клонировании большинства вирусных генов. Поэтому в данной ситуации для поиска требуемых клонов гибридов можно использовать метод радиоиммуноанализа белков *in situ*, первые варианты которого были описаны в 1978 г. В основу метода (рис. 1.21) положена способность молекул иммуноглобулинов связываться с полистиролом или поливинилом. Кроме того, предполагается, что исследуемый белок имеет не менее двух антигенных детерминант и может связывать по крайней мере две разные молекулы иммуноглобулинов, присутствующих в препарате поликлональных антител, полученных на целевой белок.

Колонии трансформантов перепечатывают идентичным образом на две чашки с агаризо-

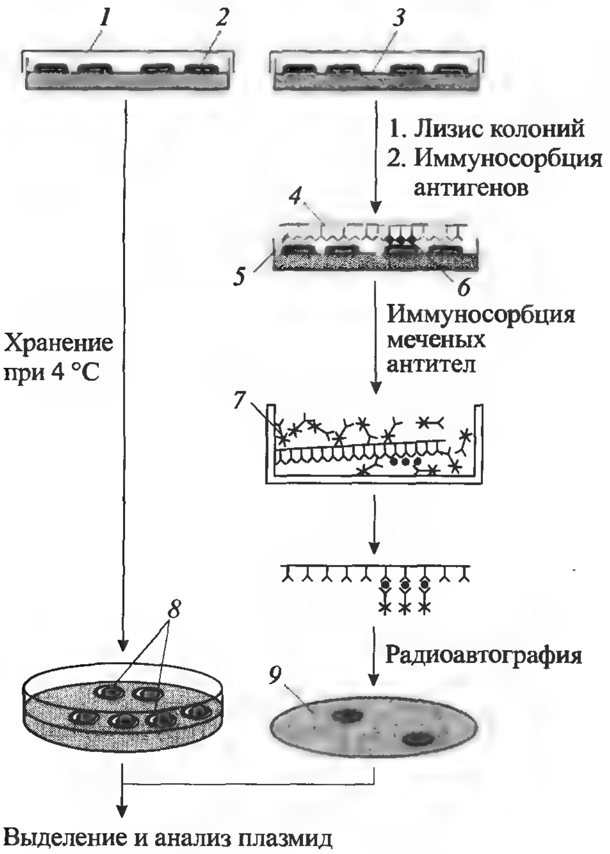


Рис. 1.21. Схема метода радиоиммуноанализа белков *in situ*:

1 — матричная чашка; *2* — колония клеток; *3* — агаризованная питательная среда; *4* — пластиковый диск с адсорбированными специфичными антителами; *5* — антитела; *6* — антигеи; *7* — ^{125}I-меченные антитела; *8* — отобранные клоны; *9* — рентгеновская плеика

ванной питательной средой и чашки инкубируют до получения колоний необходимого размера. Затем на одной из чашек лизируют бактериальные клетки и прижимают к поверхности среды поливиниловый диск с адсорбированными на нем специфическими антителами. При этом на диске происходит иммуносорбция антигена. После промывания диска на него наносят ^{125}I-меченные антитела (препарат поликлональных иммуноглобулинов) к белку искомого гена. Колонии, в которых образовался комплекс антиген–антитело, выявляют радиоавтографически. Из соответствующих колоний с матричных чашек бактерии пересевают на питательные среды и проводят анализ содержащихся в них гибридных плазмид.

1.7. РАСШИФРОВКА НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ФРАГМЕНТОВ ДНК

Бурному развитию генетической инженерии в немалой степени способствовала разработка высокоэффективных методов расшифровки нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК. В свою очередь одной из причин появления этих методов стала возможность клонировать в составе векторов целевые фрагменты ДНК и нарабатывать их в индивидуальном состоянии и в требуемых количествах. Расшифровку нуклеотидной последовательности нуклеиновых кислот в отечественной литературе принято называть ***секвенированием*** (от англ. sequencing — определение последовательности).

Высокоэффективные методы секвенирования ДНК возникли в результате объединения ряда методических достижений. Решающую роль при этом сыграла разработка методов электрофореза, позволяющих с высокой точностью разделить олигомеры, отличающиеся друг от друга по длине только на 1 нуклеотид. Важное значение также имели методы специфической химической модификации азотистых оснований в составе молекул ДНК и последующего их выщепления, способы радиоактивного мечения концевых нуклеотидов цепей ДНК изотопами ^{32}P или ^{33}P, копирования последовательностей ДНК с помощью ДНК-полимераз и некоторые другие.

1.7.1. «Плюс-минус»-метод

Первый метод секвенирования ДНК, предложенный Ф. Сэнгером и А. Коулсоном в 1975 г., основан на ферментативных реакциях и носит название «плюс-минус»-метод. Данный подход предполагает выделение одноцепочечного фрагмента ДНК, соответствующего исследуемому участку генома. Этот фрагмент используют затем в реакции полимеразного копирования в качестве матрицы, а в качестве праймера — синтетические олигонуклеотиды или природные субфрагменты, получаемые после гидролиза определенными рестриктазами.

На первом этапе осуществляют реакцию полимеризации с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli* (PolI) и всех четырех типов дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP), один из которых радиоактивно мечен по α-положению фосфата. Синтез ведут в ограниченных условиях, с тем чтобы получить набор продуктов неполного ко-

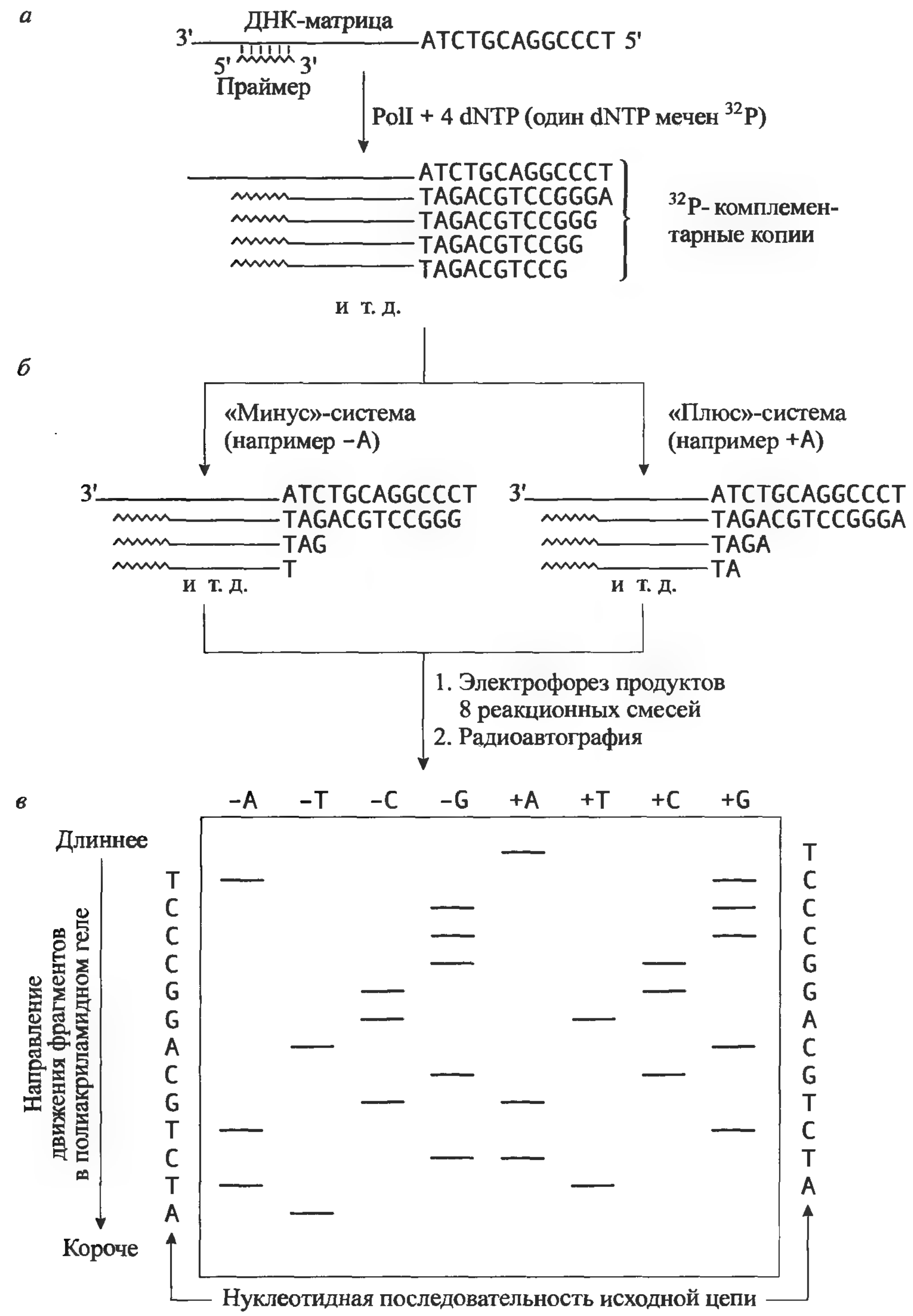


Рис. 1.22. Схема «плюс-минус»-метода секвенирования фрагментов ДНК

пирования изучаемого одноцепочечного фрагмента (рис. 1.22, *а*). Затем полимерный материал отделяют от нуклеотидов, смесь делят на восемь частей и проводят дополнительные полимеразные реакции либо в отсутствие одного из нуклеотидов при наличии остальных трех («минус»-система), либо в присутствии только одного («плюс»-система). В присутствии трех типов dNTP («минус»-система) ДНК-полимераза будет достраивать все новосинтезированные комплементарные матрице цепи до положения ближайшего нуклеотида, который отсутствует в реакционной смеси, и в этом месте синтез будет прекращаться. Таким образом, в данном случае терминация реакции полимеризации происходит во всех точках копируемых цепей п е р е д отсутствующим в смеси нуклеотидом (см. рис. 1.22, *б*).

В «плюс»-системе ДНК-полимераза проявляет два типа активностей:

- 5′–3′-полимеразную, если добавленный в реакционную смесь единственный dNTP

расположен в последовательности сразу за 3′-концом новосинтезированной цепи ДНК;

- 3′–5′-экзонуклеазную, при этом фермент деградирует новосинтезированные цепи с 3′-конца до того места, где находится присутствующий в системе dNTP. В этой точке деградация цепи останавливается, и ДНК-полимераза начинает обменивать 3′-концевой нуклеотид на присутствующий в смеси.

Как видим, в «плюс»-системе терминация реакции происходит на последовательности после нуклеотида данного типа (см. рис. 1.22, *б*).

Полученные описанным способом 8 образцов одновременно подвергают электрофоретическому разделению высокого разрешения, гель радиоавтографируют и с радиоавтографа читают последовательность нуклеотидов (см. рис. 1.22, *в*). Исходная последовательность комплементарна читаемой с радиоавтографа.

1.7.2. Метод Сэнгера

Существенным недостатком «плюс-минус»-метода является то, что получить строго статистический набор продуктов ограниченного копирования на первой стадии очень трудно. Поэтому данный подход в 1977 г. сменился другим, разработанным в той же лаборатории, возглавляемой Ф. Сэнгером. Первоначально он получил название метода терминирующих аналогов трифосфатов (метод дидезоксинуклеозидтрифосфатов), а в настоящее время называется дидезокси-методом Сэнгера. Как и в случае «плюс-минус»-метода, в его основу положено ферментативное копирование при помощи PolI исходного одноцепочечного сегмента ДНК с точки, задаваемой положением 3′-конца праймера. Специфическая терминация синтеза новых цепей ДНК обеспечивается добавлением в реакционную смесь кроме четырех типов dNTP (один из которых мечен ^{32}P по α-положению) синтетического аналога нуклеотида — 2′,3′-дидезоксинуклеозидтрифосфата (ddNTP). PolI способна включать этот аналог в растущую цепь ДНК, однако, как только включение ddNTP произошло, дальнейшее наращивание цепи прекращается ввиду отсутствия в ddNTP 3′-OH-группы (рис. 1.23, *а*).

Отношение концентраций dNTP/ddNTP подбирается экспериментально таким образом, чтобы терминация реакции полимеризации происходила вдоль копируемой цепи ДНК в среднем на каждом месте расположения нуклеотида, комплементарного использованному ddNTP. Образцы четырех реакционных смесей, содержащих по одному из типов ddNTP, наносят в соседние ячейки денатурирующего полиакриламидного геля (ПААГ) для фракционирования и после радиоавтографии геля читают последовательность с радиоавтографа (см. рис. 1.23, *б*).

Метод Сэнгера значительно упростился и получил широкое распространение после появления векторной системы на основе нитевидного фага M13. Фаг M13 содержит в составе вирионов одноцепочечную кольцевую молекулу ДНК. При репликации в инфицированных клетках *E. coli* молекула ДНК фага M13 проходит через стадию образования двухцепочечной репликативной формы, которую можно легко выделить и встроить в нее чужеродные фрагменты ДНК. Гибридные фаги в составе своих вирионов будут содержать одноцепочечную кольцевую молекулу ДНК, в которой в строго определенном месте находится одна из цепей встроенного фрагмента.

Для секвенирования дидезокси-методом Сэнгера любой последовательности ДНК, клонированной в составе генома векторного фага M13, можно использовать один и тот же (универсальный) синтетический олигонуклеотидный праймер, комплементарный последовательности ДНК фага, прилегающей к участку встройки чужеродных фрагментов. При этом нет необходимости получать специфические праймеры для секвенирования каждого индивидуального фрагмента. Этот остроумный прием позволил многократно повысить скорость секвенирования. Как правило, этим методом с использованием универсального праймера удается секвенировать последовательность размером 250–400 нуклеотидов.

1.7.3. Метод Максама–Гилберта

Наряду с ферментативным дидезокси-методом широкое распространение получил метод секвенирования ДНК, разработанный А. Максамом и В. Гилбертом в 1976 г. Метод применим к одно- или двухцепочечным фрагментам ДНК. Изучаемый полинуклеотид подвергают специфической химической фрагментации. Для того чтобы иметь точку отсчета, фрагмент ДНК метят радиоактивным изотопом ^{32}P по 5′- или 3′-концу. Чаще всего метку включают в 5′-концы с помощью полинуклеотидкиназы фага T4, которая в реакции обмена переносит радиоактивный фосфат с [γ-^{32}P] ATP на ДНК. У двухцепочечного фрагмента ДНК в такой реакции метятся обе антипараллельные цепи. Субстраты, меченные только по одному концу, при этом могут быть получены или после денатурации

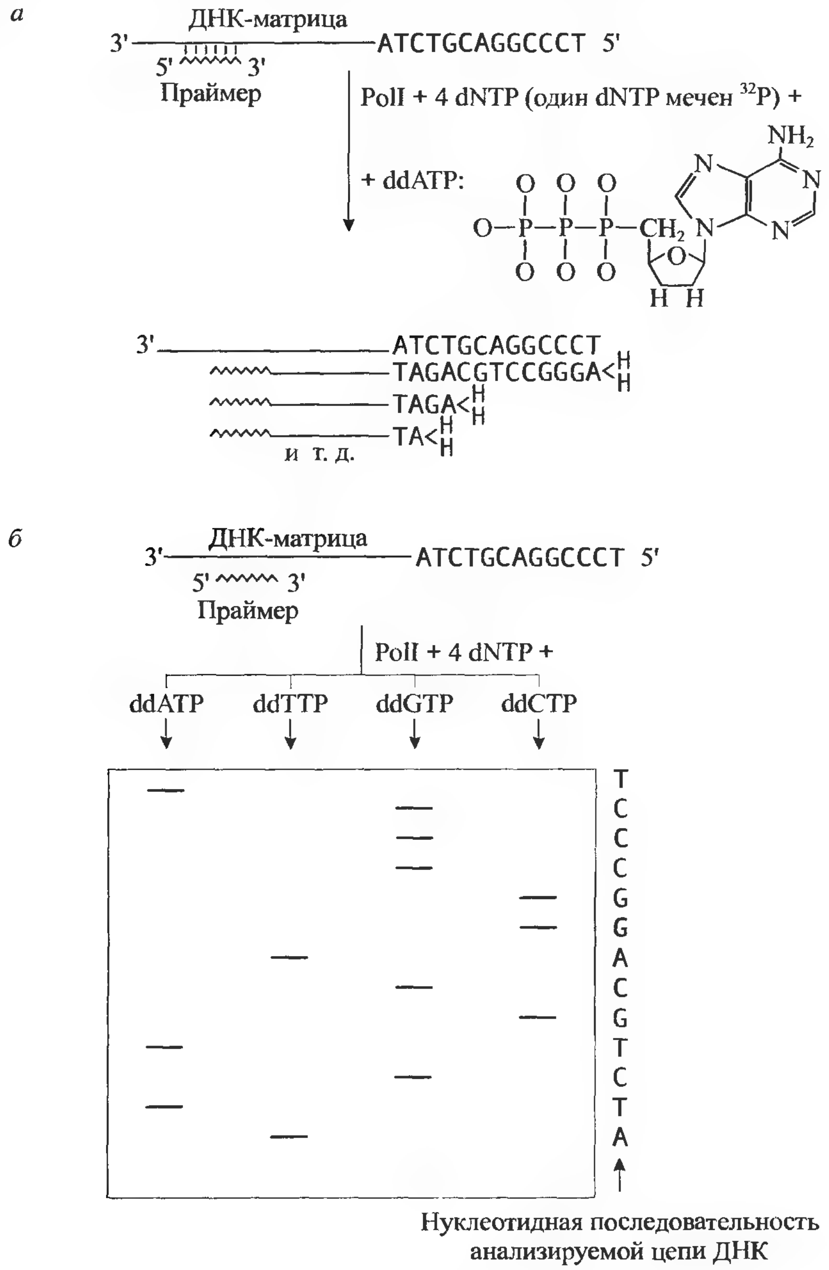


Рис. 1.23. Схема метода секвенирования ДНК по Сэнгеру

и разделения цепей фрагмента, или после гидролиза фрагмента какой-либо другой рестриктазой и последующего разделения субфрагментов электрофорезом (рис. 1.24).

Процедура подготовки меченых фрагментов для секвенирования по методу Максама–Гилберта была значительно упрощена Г. Волкаертом с соавторами в 1984 г., а в последующем и другими исследователями. Для этого использованы клонирующие векторы, в которые введены синтетические полилинкеры, содержащие на одном краю участки узнавания рестриктаз, которые при гидролизе ДНК формируют одноцепочечные липкие концы из нечетного числа нуклеотидов (рис. 1.25). Образуемые данными рестриктазами липкие концы различаются между собой по определенному нуклеотиду. Используя фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* и определенный набор радиоактивно меченных и немеченых дезоксинуклеозидтрифосфатов, удается избирательно метить клонированный фрагмент лишь по одному концу (см. рис. 1.25). После этого не требуются процедуры разделения и выделения субфрагментов или цепей ДНК, что значительно упрощает и ускоряет секвенирование методом химической деградации.

Полученный тем или иным способом препарат фрагмента ДНК, радиоактивно меченного по одному концу, делят на порции и каждую

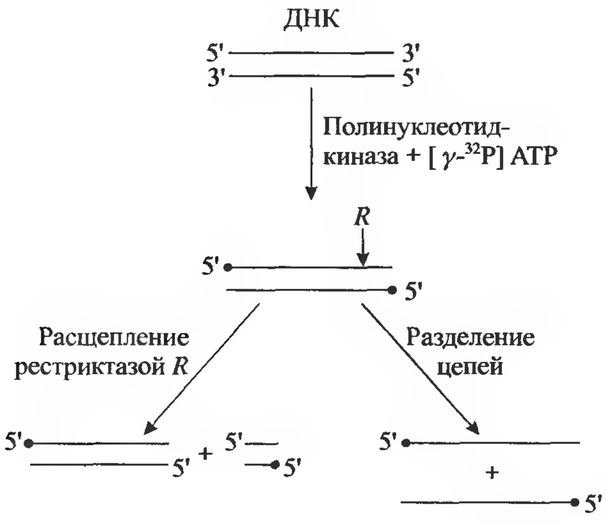


Рис. 1.24. Схема получения из двухцепочечного фрагмента ДНК препаратов, радиоактивно меченных по одному концу. Черным кружком обозначен ^{32}P-фосфат

подвергают определенной химической модификации. Модификацию проводят с таким расчетом, чтобы в среднем на молекулу ДНК приходилось одно модифицированное основание данного типа. Поскольку любое основание одного типа независимо от положения на молекуле ДНК равновероятно подвергается химической модификации, то в препарате ДНК имеются молекулы с модификацией по каждому положению этого основания.

А. Максам и В. Гилберт предложили модифицировать пуриновые основания диметилсульфатом. При этом происходит метилирование адениновых остатков по положению N^3, гуаниновых — по N^7. Обработка препарата модифицированной таким образом ДНК 0,1 М HCl при температуре 0 °C приводит к выщеплению метиладенина. Дальнейшая инкубация при температуре 90 °C в щелочной среде (0,1 М NaOH) вызывает разрыв сахаро-фосфатной цепи ДНК в местах выщепления оснований (рис. 1.26). После обработки пиперидином происходит гидролиз цепи ДНК по остаткам метилгуанина. Пиримидиновые основания модифицируются гидразином. Если реакцию вести в бессолевой среде, то модифицируются как цитозин, так и тимин; если же обработку проводить в присутствии 2 М NaCl, то модифицируется лишь цитозин. После добавления пиперидина цепи ДНК расщепляются по точкам модификации. Как видим, параллельное проведение четырех различных обработок радиоактивно меченного по концу фрагмента ДНК позволяет в итоге иметь наборы субфрагментов, после одновременного разделения которых путем электрофореза в соседних дорожках полиакриламидного геля и радиоавтографии геля на рентгеновской пленке можно прочитать нуклеотидную последовательность ДНК (рис. 1.27). В отличие от метода Сэнгера здесь чтение радиоавтографа является прямым.

Для модификации оснований и расщепления по ним молекул ДНК могут быть использованы также другие химические реакции. Поскольку действие химических реагентов не зависит от

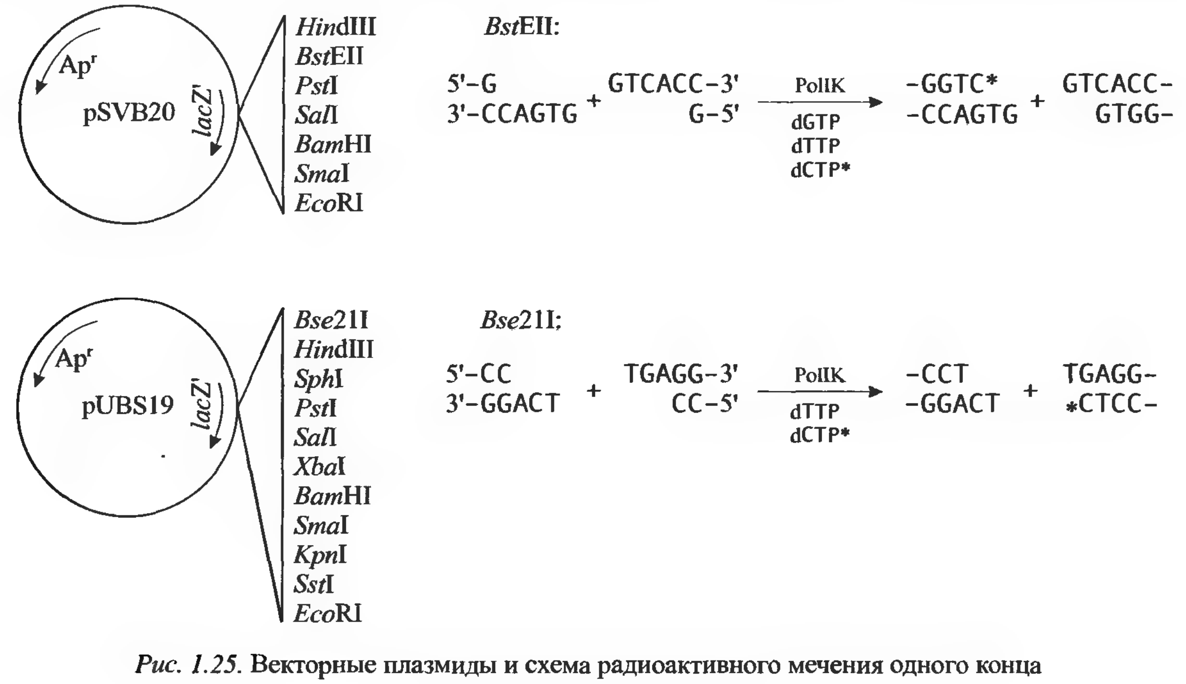


Рис. 1.25. Векторные плазмиды и схема радиоактивного мечения одного конца двухцепочечных фрагментов ДНК

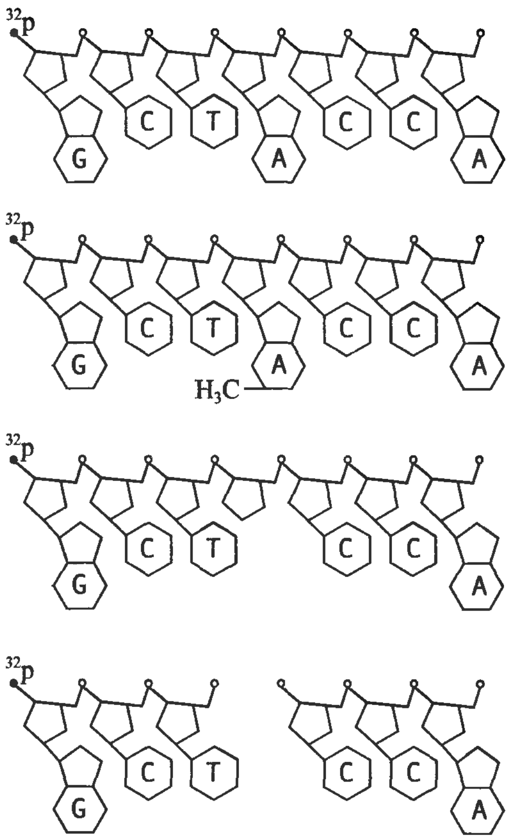
а

Фрагмент ДНК, меченный по одному концу ^{32}P

Модификация азотистого основания

Выщепление модифицированного основания

Разрыв сахаро-фосфатной цепи ДНК



б

^{32}pApCpTpApCpTpGpApApTpApCpCpApGpApC

A A A A A A A

^{32}p

^{32}pApCpTp

^{32}pApCpTpApCpTpGp

^{32}pApCpTpApCpTpGpAp

^{32}pApCpTpApCpTpGpApApTp

^{32}pApCpTpApCpTpGpApApTpApCpCp

^{32}pApCpTpApCpTpGpApApTpApCpCpApGp

^{32}pApCpTpApCpTpGpApApTpApCpCpApGpApC

Рис. 1.26. Химическое расщепление ДНК в методе Максама–Гилберта на примере аденинспецифической реакции с диметилсульфатом:
а — химическая модификация аденина и расщепление полинуклеотидной цепи по модифицированным звеньям; *б* — набор терминально меченных фрагментов ДНК, получаемых в результате химической обработки олигонуклеотида, представленного в верхней строке

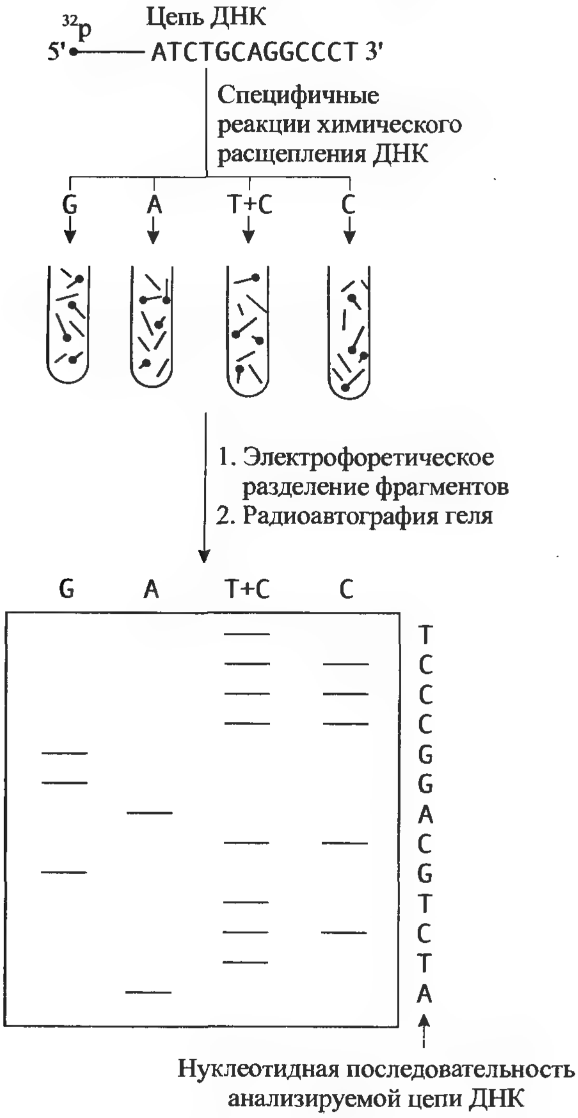


Рис. 1.27. Схема метода секвенирования ДНК по Максаму–Гилберту

длины ДНК, ограничение на размер фрагмента, который может быть секвенирован за один эксперимент, налагается возможностями электрофоретического разделения фрагментов. При увеличении длины пластины геля и силы тока можно достигнуть большей разрешающей способности электрофореза фрагментов ДНК. За один цикл методом Максама–Гилберта обычно прочитывают не более 250–300 нуклеотидов, но при отлаженных процедурах можно одномоментно определить до 500 и более нуклеотидов. При секвенировании протяженных фрагментов ДНК их гидролизуют различными рестриктазами и расшифровывают последовательность нуклеотидов перекрывающихся субфрагментов (рис. 1.28). Для снижения вероятности ошибки обычно проводят секвенирование обеих взаимокомплементарных цепей фрагмента ДНК.

1.7.4. Автоматическое секвенирование ДНК

Необходимость получения информации о последовательности нуклеотидов в ДНК во всевозрастающих масштабах поставила вопрос об автоматизации процесса секвенирования ДНК, поскольку применявшиеся до этого ручные методы уже не позволяли справляться с такими большими объемами работы.

Под автоматическим секвенированием ДНК понимается в первую очередь электрофоретическое разделение меченых продуктов терминирующих реакций с помощью специальных приборов — автоматических секвенаторов ДНК. Автоматизации с помощью лабораторных биороботов подвергаются также процесс наработки матриц для их последующего ферментативного секвенирования и проведение секвенирующих реакций. Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан в 1987 г. фирмой Applied Biosystems (США).

Для мечения вновь синтезируемых цепей ДНК в условиях терминации при автоматическом секвенировании используют молекулу какого-либо флуоресцирующего соединения. К подобным соединениям предъявляется ряд требований. Во-первых, они должны иметь высокий квантовый выход при флуоресценции, обеспечивающий в приборах разного типа детекцию очень малых количеств ДНК. Во-вторых, у флуорофоров, используемых для мечения разных азотистых оснований с их последующей детекцией в одной дорожке секвенирующего геля или в одном капилляре, должны быть неперекрывающиеся или незначительно перекрывающиеся спектры эмиссии. В-третьих, желательно, чтобы флуоресцентные красители, используемые для разных нуклеотидов, не различались существенно по своему влиянию на электрофоретическую подвижность меченных ими фрагментов ДНК.

Принцип автоматического секвенирования ДНК заключается в электрофоретическом разделении флуоресцентно меченных продуктов специфически терминированных секвенирующих реакций и их детекции в режиме реального времени. Детекция осуществляется в нижней части геля, где в момент прохождения фрагментов ДНК происходит возбуждение молекул красителя лазерным лучом.

Существуют различные схемы проведения терминирующих реакций и последующего разделения продуктов в секвенирующем гель-электрофорезе. Так, довольно обычным, в том числе и для неавтоматического секвенирова-

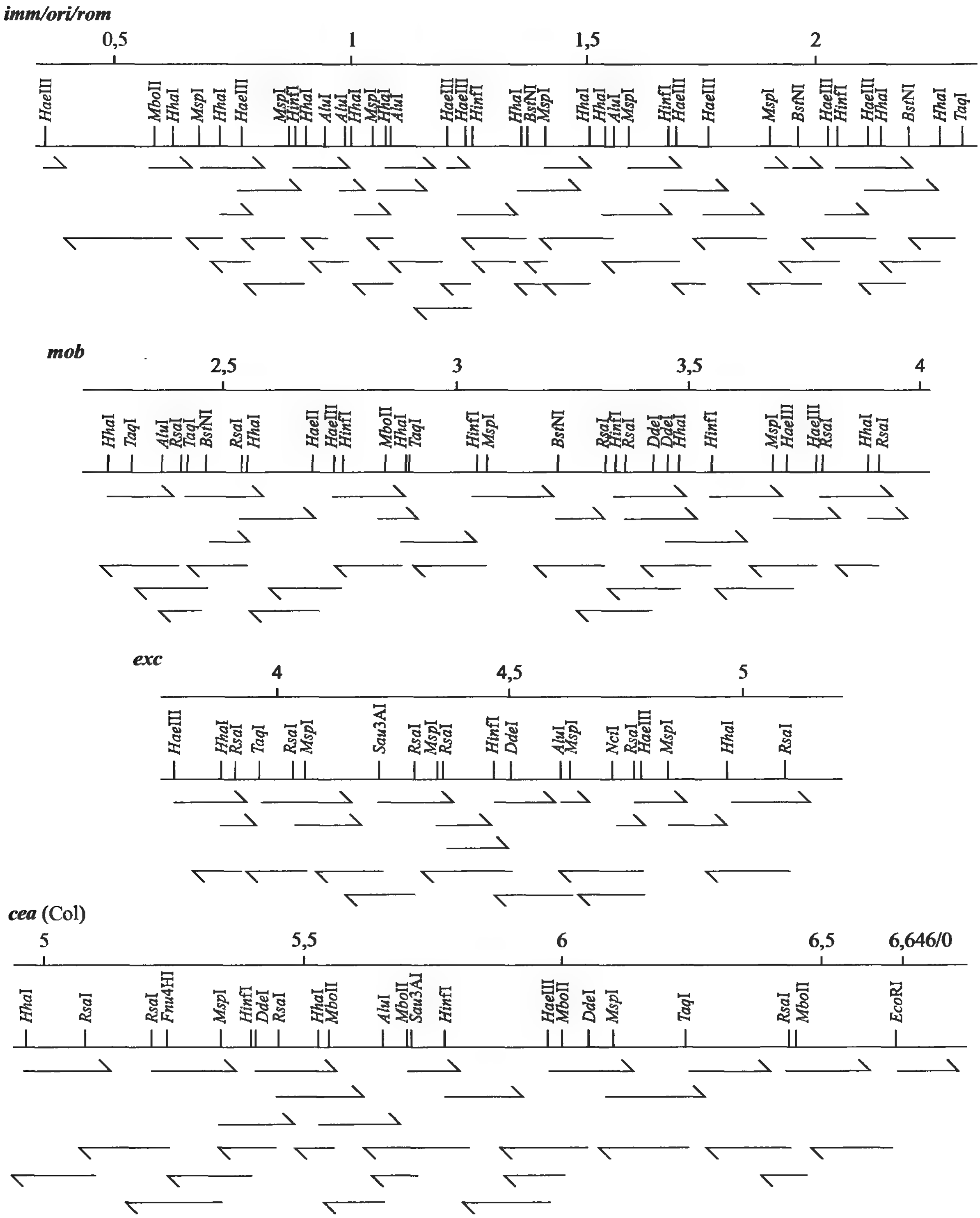


Рис. 1.28. Стратегия расшифровки полной последовательности нуклеотидов плазмиды ColE1 методом Максама–Гилберта.

Цифрами обозначены координаты на молекуле ДНК в тыс. пар нуклеотидов. Выше координатной линии обозначены генетические элементы плазмиды, находящиеся на данном сегменте ДНК. Нанесены места узнавания ряда рестриктаз, используемых при подготовке фрагментов для секвенирования. Разнонаправленными полустрелками обозначены независимо расшифрованные участки разных цепей молекулы ДНК

ния, является вариант, когда проводят 4 типа терминирующих реакций и разделяют продукты в четырех дорожках геля. При другом варианте (4 реакции/1 дорожка) также проводят 4 типа реакций, используя флуоресцентные метки с различными спектрами эмиссии. Разделение в этом случае возможно в одной дорожке геля. В результате экономится гелевое пространство и в 4 раза повышается производительность метода.

Автоматические секвенаторы ДНК управляются специально созданными компьютерными программами. Так, например, приборы фирмы Applied Biosystems комплектуются программами сбора и анализа данных. После завершения электрофоретического разделения предварительные данные, собранные программой Data Collection, подвергаются анализу с помощью специальной программы. При этом определяется относительная высота пиков, соответствующих фрагментам ДНК, терминированным тем или иным типом нуклеотидного основания, и ликвидируются некоторые погрешности.

Серьезное значение в автоматическом секвенировании ДНК приобретает точность определения нуклеотидной последовательности, поскольку в большинстве случаев экспериментатор не участвует в процессе ее чтения и занесения в компьютер.

В автоматическом секвенировании ДНК для разделения флуоресцентно меченных продуктов терминирующих реакций, кроме электрофореза в стандартных пластинах полиакриламидного геля, широко используется капиллярный гель-электрофорез. Для него характерны высокая чувствительность и высокая скорость разделения, являющиеся следствием крайне малого внутреннего диаметра самого капилляра.

В ранних работах по секвенирующему капиллярному электрофорезу гелевым матриксом служил обычный полиакриламидный гель. Однако его нестабильность, формирование пузырьков воздуха, видимых при микроскопическом исследовании капилляров, заметно снижали производительность метода. Применение линейного полиакриламида позволило снять эти проблемы и способствовало развитию данного метода.

Современные автоматические секвенаторы несравнимо превосходят человека по производительности, более того, каждый год такие автоматы удается улучшать. Все это ведет к тому, что секвенирование фрагментов ДНК становится простой процедурой, доступной в любой молекулярно-биологической лаборатории.

1.7.5. Базы данных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

Нарастающее число секвенированных нуклеотидных последовательностей, принадлежащих разным организмам, заставило задуматься об упорядочении их хранения, что привело к созданию «коллекций» таких последовательностей. Первая электронная база данных Los Alamos DNA Database, содержащая информацию о секвенированных последовательностях ДНК, была организована У. Гоадом и его коллегами в Лос-Аламосской национальной лаборатории (LANL) в США. К 1981 г. в ней уже содержалась информация о 280 опубликованных нуклеотидных последовательностях общей протяженностью около 370 тыс. пн (тпн). В 1982 г. на ее основе под патронажем Национального института здоровья (NIH) был организован новый банк данных генетических последовательностей GenBank. Его адрес в Интернете: www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank.

GenBank является американской базой данных и финансируется правительством США, хотя и содержит информацию, собранную со всего мира. Созданная в 1980 г. в Европе аналогичная база данных EMBL Data Library явилась первым международным хранилищем информации о последовательностях ДНК. Основные цели, преследовавшиеся при ее организации, — это обеспечение бесплатного доступа к коллекции опубликованных нуклеотидных последовательностей, выработка определенных стандартов и развитие информационного и компьютерного обеспечения проводимых молекулярно-биологических исследований. Свой первый релиз, охватывающий информацию о 568 последовательностях общей протяженностью 585 433 нуклеотида, EMBL Data Library выпустила в апреле 1982 г. Первое время очередные релизы, распространяемые на магнитных лентах, предоставлялись по запросу любому желающему. Однако рост как самой базы, так и числа пользователей привел к тому, что дальнейшие выпуски стали распространяться по подписке. В 1994 г. база данных EMBL Data Library трансформировалась в EMBL Nucleotide Sequence Database и стала курироваться Европейским институтом биоинформатики (European Bioinformatics Institute, или EBI). Его адрес в Интернете: www.ebi.ac.uk.

С 1986 г. в Японии начал функционировать банк данных DDBJ (DNA Data Bank of Japan). В 1995 г. в Японии был создан Центр информационной биологии (CIB), и DDBJ, организован-

ный ранее по инициативе Национального института генетики, перешел к нему в подчинение. Его адрес в Интернете: www.ddbj.nig.ac.jp.

В настоящее время действует International Nucleotide Sequence Database (INSD), возникшая в результате сотрудничества между GenBank, EMBL и DDBJ. Главными составляющими этого сотрудничества являются единые требования, предъявляемые к авторам при занесении ими нуклеотидных последовательностей, присвоение единых для этих банков инвентарных номеров, регулярный ежедневный обмен информацией о новых нуклеотидных последовательностях.

С развитием электронных средств связи заносить нуклеотидную последовательность и сведения о ней в банки данных стало возможным посредством электронной почты и через Интернет.

GenBank обычно присваивает инвентарный номер какой-либо нуклеотидной последовательности в течение нескольких рабочих дней с момента получения. Инвентарные номера ранее состояли из одной буквы и пяти цифр (например L22579), однако бурный рост числа секвенированных фрагментов ДНК привел к необходимости перейти к новой системе, и теперь номера включают 2 буквы и 6 цифр (например AF380138). Следует отметить, что присвоенные ранее номера остаются шестисимвольными и их трансформация в восьмизначные проводиться не будет.

Важной особенностью сбора и хранения информации о секвенированных нуклеотидных последовательностях в базах данных является ее доступность для исследователей. Вслед за отказом многих научных журналов публиковать в оригинальных статьях последовательности нуклеотидов, ограничиваясь только их инвентарными номерами в соответствующем международном банке данных, роль этих банков как источников информации существенно возросла.

В настоящее время возникла парадоксальная ситуация, когда для большого числа генов известна последовательность нуклеотидов, но о функции этих генов или ничего не известно, или известно очень мало. Крупнейшей базой данных аминокислотных последовательностей является SWISS-PROT, существующая с 1986 г. Банки нуклеотидных последовательностей ДНК и аминокислотных последовательностей белков, снабженные соответствующими компьютерными программами, обеспечивают возможность сравнивать расшифрованные последовательности генов и их белковых продуктов с уже известными, что по мере накопления информации все с большей достоверностью позволяет предсказывать функции анализируемых белков.

1.7.6. Геномные проекты

Разработка быстрых методов секвенирования сделала возможным определение нуклеотидных последовательностей крупных молекул ДНК, а не только их фрагментов. В 1978 г. Ф. Сэнгер с соавторами опубликовали первую полную последовательность геномной одноцепочечной ДНК бактериофага ϕX174, имеющей размер 5386 нуклеотидов. Следующий рубеж был преодолен при определении нуклеотидной последовательности митохондриальной ДНК человека (16 569 пн) в 1981 г. Серьезным успехом явилось определение полной нуклеотидной последовательности ДНК бактериофага λ, состоящей из 48 502 пн. В 1992 г. С. Н. Щелкунов с соавторами вручную методом Максама–Гилберта секвенировали геном вируса натуральной оспы (186 тпн). До 1995 г. наиболее крупными геномами с известной последовательностью нуклеотидов были ДНК цитомегаловируса (229 тпн) и ДНК вируса осповакцины (192 тпн).

Появление высокопроизводительных методов секвенирования ДНК позволило определять последовательности более крупных геномов. Значительная роль в этом принадлежит автоматизации всего процесса секвенирования, начиная от приготовления матриц и заканчивая занесением определенных последовательностей ДНК в компьютер без непосредственного участия оператора.

Расшифровка крупных геномов прокариотических и эукариотических клеток потребовала объединения усилий разных лабораторий и формирования геномных проектов.

В июле 1995 г. была опубликована первая нуклеотидная последовательность полного генома (1 830 137 пн) самостоятельно существующего организма — грамотрицательной бактерии *Haemophilus influenzae*. Геном этой бактерии характеризуется относительно низким содержанием GC-пар (38 %), причем найдено 7 протяженных участков с более высоким (около 50 %) содержанием GC-пар. Анализ нуклеотидной последовательности позволил обнаружить предположительный ориджин репликации (область начала репликации), состоящий из 280 пн, 6 оперонов рРНК, 54 гена тРНК для всех 20 аминокислот. На основании полученных данных была составлена кольцевая карта хромосомы *H. influenzae*. Из 1743 вычисленных открытых рамок трансляции (ОРТ) для 736 не уда-

лось выявить функции кодируемых ими белков. Около 78 % ОРТ *H. influenzae* обнаружили гомологию с представленными в базах данных последовательностями других организмов.

В 1997 г. объединенными усилиями нескольких научных центров США и Мексики удалось секвенировать полный геном (4 639 221 пн) другой грамотрицательной бактерии — *Escherichia coli* K-12 (штамм MG1655). Содержание GC-пар в геноме *E. coli* составило 50,8 %. Компьютерный анализ выявил 4288 потенциальных ОРТ, принадлежащих как действительно существующим генам, так и гипотетическим. Для 38 % ОРТ удалось определить функции кодируемых ими белков. Для реальных и потенциальных белков стартовыми триплетами являются ATG (3542 случая), GTG (612), TTG (130). Частота встречаемости терминирующих триплетов также заметно различается: TAA (2705 раз), TGA (1257), TAG (326). У 405 генов показано перекрывание стартового и терминирующего триплетов: ATGA (224 случая), TAATG (98), TGATG (48), GTGAA (28), TAGTG (4), TTGA (3). Сравнение белков (ОРТ) *E. coli* и *H. influenzae* (в расчет принималась по крайней мере 30%-ная идентичность аминокислот на 60 % всей последовательности белка) показала, что 1130 из 1743 потенциальных белков *H. influenzae* совпадают с таковыми *E. coli*.

Секвенирование полного генома грамположительной бактерии *Bacillus subtilis* (штамм 168) было осуществлено усилиями международного консорциума, в который входили 25 европейских, 7 японских и 1 южнокорейская лаборатории. Размер генома *B. subtilis* составил 4 214 810 пн, содержание GC-пар — 43,5 %.

Первым эукариотическим организмом, полная последовательность которого (12 млн 68 тыс. пн) была определена в 1996 г., стали дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Это явилось результатом усилий большого числа исследователей, работающих в лабораториях и крупных исследовательских центрах стран Западной Европы, США и Японии. Анализ нуклеотидной последовательности позволил выявить 6034 потенциальных ОРТ. Относительно небольшой размер генома дрожжей *S. cerevisiae* в некоторой степени можно объяснить малым размером интронов в генах и их незначительным числом. Кроме того, только около 4 % генов дрожжей содержат интроны.

Огромные успехи в расшифровке последовательности молекул ДНК привели к тому, что в 1990 г. в США была принята официальная программа по расшифровке генома человека (Human Genome Project, HGP), в рамках которой планировалось при вложении 3 млрд долларов США завершить секвенирование полного генома человека в течение 15 лет. Основным исполнителем HGP стала компания Celera Genomics. Аналогичные проекты по геному человека также начали реализовываться в Западной Европе, Японии и России.

В 2001 г. участники американской программы HGP и Международного консорциума по секвенированию генома человека, объединяющего многочисленные научные организации США, Великобритании, Германии, Франции, Японии и Китая, независимо объявили о завершении секвенирования большей части (более 95 %) генома человека. На основании полученных данных стало возможным сделать ряд выводов об организации генома человека.

Компанией Celera Genomics в рамках проекта по секвенированию генома человека использовалось пять образцов человеческой ДНК от двух женщин и трех мужчин. Среди этих людей были один афроамериканец, один китаец, один испано-мексиканец и двое европейцев. На основании данных секвенирования пяти образцов ДНК была рассчитана консенсусная последовательность генома человека длиной 2,91 млрд пн. Компьютерный анализ позволил обнаружить 26 588 транскрибируемых и транслируемых в белки генов, а также еще около 12 тыс. предсказанных генов. Экзоны занимают лишь 1,1 % генома, в то время как интроны — 24 %. Остальная часть генома (75 %) представ-

Таблица 1.5. **Примеры секвенирования полных геномов разных типов организмов**

Организм	Размер генома, млн пн	Предполагаемое число генов	Год завершения секвенирования
Бактерия (*Haemophilus influenzae*)	1,8	1743	1995
Дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*)	12,1	6102	1996
Круглый червь (*Caenorhabditis elegans*)	97	19 099	1998
Растение (*Arabidopsis thaliana*)	100	25 000	2000
Насекомое (*Drosophila melanogaster*)	180	13 061	2000
Человек (*Homo sapiens*)	3000	35 000 – 45 000	После 2003

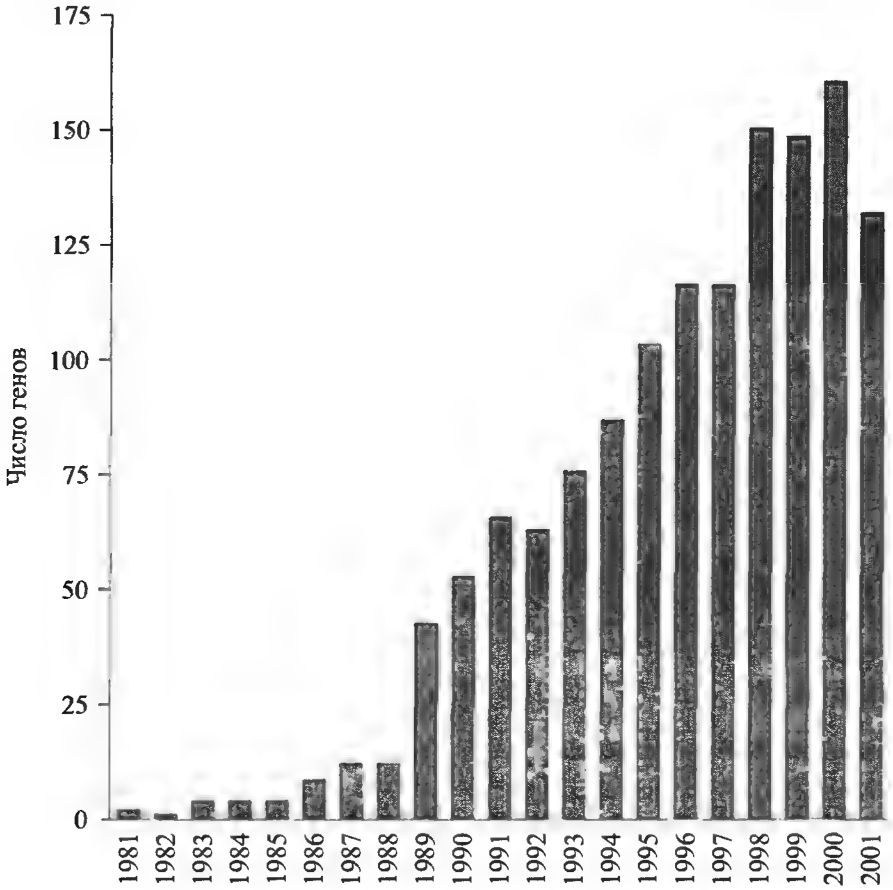


Рис. 1.29. Динамика обнаружения генов, мутации по которым обусловливают различные заболевания человека

Таблица 1.6. **Примеры секвенирования геномов патогенных микроорганизмов**

Организм	Вызываемое заболевание	Размер генома, млн пн	Секвенирующее учреждение	Год публикации
		Секвенированные геномы		
Haemophilus influenzae	Менингит, пневмония	1,8	TIGR[1]	1995
Mycobacterium tuberculosis	Туберкулез	4,4	Сэнгер-центр, Институт Пастера	1998
Campylobacter jejuni	Диарея	1,6	Сэнгер-центр	2000
Escherichia coli 0157 (два штамма)	Пищевое отравление	5,5	Университет Висконсина, Японский консорциум	2000
Vibrio cholerae	Холера	4,0	TIGR	2000
Mycobacterium leprae	Проказа	3,3	Сэнгер-центр	2000
Neisseria meningitides	Менингит	2,3	TIGR, Сэнгер-центр	2000
Streptococcus pneumoniae	Пневмония	2,2	TIGR	2001
Yersinia pestis	Чума	4,7	Сэнгер-центр	2001
Salmonella typhi (CT18)	Брюшной тиф	4,5	Сэнгер-центр	2001
Shigella flexneri	Дизентерия	4,6	Университет Висконсина	2003
		Геномы в процессе секвенирования		
Plasmodium falciparum	Малярия	30	Консорциум по геному малярии	
Leishmania major	Лейшмания	33,6	Сэнгер-центр, Европейский консорциум	
Trypanosoma brucei	Африканская сонная болезнь	25	TIGR, Сэнгер-центр	
Aspergillus fumigatus	Грибковая инфекция	30–35	Сэнгер-центр, TIGR, Институт Пастера, Университет Саламанки, Университет Нагасаки	
Bacillus anthracis	Сибирская язва	4,5	TIGR	

Примечание. Источники информации: www.tigr.org; www.sanger.ac.uk.

[1] Институт по исследованию генома (The Institute for Genome Research).

лена межгенными последовательностями. При сравнении данных секвенирования с консенсусной последовательностью генома человека было выявлено 2,1 млн позиций однонуклеотидного полиморфизма (single-nucleotide polymorphism, SNP), т. е. позиций, по которым имеются различия от человека к человеку. Менее 1 % этих SNP приводят к изменению последовательности белков. Интересно, что число обнаруженных генов в геноме у человека лишь в два раза больше, чем у нематоды *Caenorhabditis elegans* (табл. 1.5).

Полученные данные о структуре генома позволят значительно продвинуть наше понимание генетики человека, природы различных наследственных заболеваний. С каждым годом обнаруживается все больше генов, мутации по которым приводят к определенным заболеваниям человека (рис. 1.29). В настоящее время их выявлено более 1,2 тыс. Такие исследования могут революционизировать медицинскую науку.

Широкое развитие получили также проекты по секвенированию и анализу полных геномов патогенных микроорганизмов (табл. 1.6). В ближайшие годы планируется расшифровать структуру геномов более чем 100 видов болезнетворных микроорганизмов. Секвенированных вирусных геномов уже насчитывается более 600. Накапливаемая информация позволяет выяснять молекулярные механизмы патогенного действия микроорганизмов на инфицируемый организм, глубоко изучать защитные механизмы, реализуемые человеком, животными, растениями в ответ на конкретную инфекцию. Это создает базу знаний, необходимых для эффективной разработки современных средств и методов лечения инфекционных заболеваний.

1.8. АМПЛИФИКАЦИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК *IN VITRO*

1.8.1. Полимеразная цепная реакция

В 1985 г. К. Маллис с сотрудниками разработали метод амплификации фрагментов ДНК, названный полимеразной цепной реакцией, ПЦР (polymerase chain reaction, PCR). Процедура состоит в следующем. К анализируемому образцу ДНК добавляют в избытке два синтетических олигонуклеотида-праймера размером около 20 нуклеотидов, каждый из которых комплементарен одному из 3′-концов антипараллельных цепей целевого сегмента ДНК. Препарат ДНК подвергают термической денатурации, и затем в процессе отжига происходит эффективная гибридизация олигонуклеотидов-праймеров с комплементарными последовательностями на разных цепях ДНК (рис. 1.30, *а*). После этого вносят ДНК-полимеразу, дезоксинуклеозидтрифосфаты, и осуществляется реакция полимеризации вторых цепей, инициируемая на праймерах (первый цикл). После остановки реакции ДНК снова денатурируют нагреванием. В процессе охлаждения праймеры, находящиеся в избытке, вновь эффективно гибридизуются, причем уже не только с цепями исходной ДНК, но и с вновь синтезированными.

Внесение в систему ДНК-полимеразы инициирует второй цикл полимеразной реакции (см. рис. 1.30, *б*). Многократное повторение описанной процедуры позволяет провести 30 и более циклов ферментативного удлинения праймеров. При этом число сегментов ДНК, ограниченных с обоих концов используемыми праймерами, с каждым циклом ПЦР увеличивается экспоненциально (приближается к зависимости 2^n, где n — число циклов). Выход всех других продуктов реакции увеличивается по линейной зависимости (см. рис. 1.30, *в, г*). Таким образом, в процессе рассматриваемой реакции эффективно амплифицируется только та последовательность ДНК, которая задана (ограничена) олигонуклеотидами-праймерами.

Первоначально для ПЦР использовали фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* (PolIK). Однако после каждого цикла реакции необходимо было вносить в реакционную смесь новую порцию фермента. Кроме того, в оптимальных температурных условиях такой полимеразной реакции (37 °С) появлялись вторичные участки связывания праймеров и наблюдалась амплификация незапланированных сегментов генома, т. е. специфичность амплификации не была полной. Устранить эти недостатки удалось после замены PolIK на ДНК-полимеразу термофильной бактерии *Thermus aquaticus* (полимераза *Taq*). Температурный оптимум реакции, направляемой *Taq*, находится в районе 70 °С. Другим важным свойством данного фермента является то, что он не инактивируется после длительной инкубации при 95 °С. Полимераза *Taq* представляет собой мономерный белок с молекулярной массой 94 кДа, обладает 5′–3′-полимеразной и 5′–3′-экзонуклеазной активностями.

Используя *Taq*-полимеразу, удалось решить сразу две проблемы. Во-первых, термостабильный фермент не инактивируется на этапе дена-

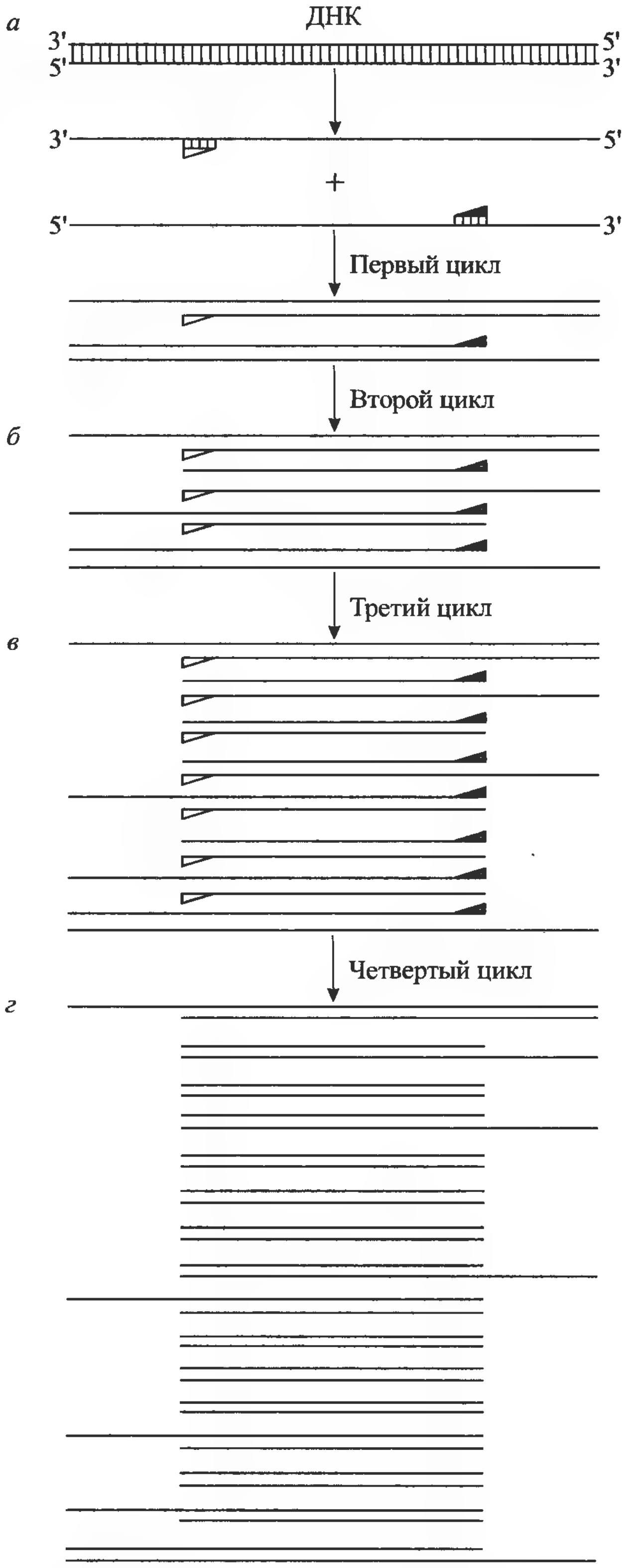


Рис. 1.30. Схема полимеразной цепной реакции (ПЦР)

турации ДНК, и поэтому нет необходимости после каждого цикла реакции добавлять его новую порцию. Такое упрощение процедуры позволило автоматизировать проведение ПЦР, так как теперь требовалось лишь через определенные интервалы времени изменять температурные условия: 90–95 °С (температура денатурации) и 60–70 °С (температура ренатурации ДНК и ферментативной реакции). Во-вторых, высокий температурный оптимум реакции, катализируемой *Taq*-полимеразой, позволяет в зависимости от содержания GC-пар в праймерах подбирать жесткие температурные условия отжига, обеспечивающие гибридизацию праймеров только в заданном районе изучаемого генома, что существенно повышает специфичность и чувствительность метода. Данный вариант ПЦР сразу нашел широкое применение.

Используя метод ПЦР, можно *in vitro* селективно обогащать препарат ДНК фрагментом с определенной последовательностью в миллион и более раз. Это позволяет надежно выявлять однокопийные гены и их варианты в таких больших и сложных геномах, каким является геном человека. Чувствительность метода такова, что амплифицировать в ПЦР и обнаружить целевую последовательность можно даже в том случае, если она встречается однажды в образце из 10^5 клеток. Получаемый сегмент ДНК надежно выявляется в виде дискретной полосы после электрофоретического разделения молекул ДНК и окраски этидиум бромидом. Более того, размноженный *in vitro* фрагмент получают в количествах, достаточных для его прямого секвенирования. Поскольку при этом не требуется промежуточный этап клонирования фрагмента ДНК в молекулярных векторах, ПЦР иногда называют бесклеточным молекулярным клонированием (cell-free molecular cloning). Автоматизированная процедура *Taq*-полимеразной цепной реакции, состоящая из 30 и более циклов, занимает 3–4 ч. Она существенно быстрее и проще процедуры клонирования фрагмента ДНК в составе векторных молекул. Однако следует отметить, что метод ПЦР не заменяет методов молекулярного клонирования фрагментов ДНК, так как прежде чем осуществить амплификацию *in vitro* определенного локуса, необходимо знать его первичную структуру, а это возможно только после предварительного клонирования изучаемого участка генома и его секвенирования.

Наряду с явными преимуществами метод ПЦР имеет и определенные недостатки. *Taq*-полимераза в процессе катализируемой ею реакции *in vitro* ошибочно включает некомплементарный нуклеотид с частотой $1{,}1 \cdot 10^{-5}$ в одном цикле. Синтезированные последовательности, содержащие ошибки, затем амплифицируются по экспоненциальной зависимости. Это приво-

дит к тому, что после 30 циклов ПЦР частота ошибок в амплифицированной ДНК может достигать 0,25 %. Фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* делает ошибки с частотой 10^{-4}–10^{-6} на пару нуклеотидов, что после 27 циклов амплификации может вызывать накопление ошибок до 0,17 %.

В то же время небольшая фракция мутантных последовательностей не влияет на результат таких аналитических процедур, как прямое секвенирование и гибридизация на фильтрах со специфичными олигонуклеотидными пробами. Ошибки, возникшие на этапе клонирования и секвенирования индивидуальных амплифицированных *in vitro* фрагментов, легко выявляются анализом нескольких независимых клонов гибридных ДНК и установлением исходной, наиболее часто встречающейся последовательности нуклеотидов. Если ошибка была введена на начальной стадии амплификации сегмента ДНК, то мутантная форма может составлять большую долю полученного препарата. В этом случае для достижения достоверного результата и выявления гибридной ДНК, содержащей природную последовательность, необходимо осуществлять либо прямое секвенирование независимо амплифицированных проб ДНК, либо анализ ряда клонов гибридных молекул ДНК, полученных после независимых ПЦР.

Разные ДНК-полимеразы осуществляют ПЦР с различной эффективностью. Так, для PolIK и ДНК-полимеразы фага T4 степень амплификации быстро снижается, если размер амплифицируемого сегмента превышает 250 пн, в то время как ДНК-полимеразы *Taq* и фага T7 способны с высоким выходом амплифицировать фрагменты, имеющие размер до 2000 пн. С помощью полимеразы *Taq* удается амплифицировать фрагменты ДНК размером не более 5 тпн. Это ограничение, по-видимому, обусловлено отсутствием у фермента корректирующей 3′–5′-экзонуклеазной активности. В ПЦР на стадии полимеризации *Taq* связывается с праймером и достраивает цепь на матрице. Изредка *Taq* ошибочно включает некомплементарный матрице нуклеотид, после чего скорость удлинения синтезируемой цепи снижается в 10^3–10^6 раз. Преодолеть эту проблему удалось, объединив *Taq* с другим термостабильным ферментом — полимеразой *Pirococcus* sp. GB-D, обладающей корректирующей 3′–5′-экзонуклеазной активностью. Этот фермент может связываться с ошибочно включенным неспаренным нуклеотидом после диссоциации комплекса этого нуклеотида с полимеразой *Taq* и удалить его. Это позволяет *Taq* продолжить ДНК-полимеразную реакцию с нормальной скоростью и, как результат, дает возможность амплифицировать фрагменты ДНК длиной до 30 тпн. Такая реакция получила название ***протяженная ПЦР*** (long PCR, LPCR). Другим следствием добавления полимеразы *Pirococcus* sp. GB-D явилось увеличение точности синтеза амплифицируемого фрагмента ДНК. Частота ошибок снизилась до $2{,}3 \cdot 10^{-6}$.

В процессе развития работ с использованием ПЦР возникла идея амплифицировать в одной пробирке сразу несколько различных генетических локусов. В этом случае одновременно используют более одной пары олигонуклеотидных праймеров. Такая реакция получила название ***мультиплексная ПЦР*** (МПЦР).

Данный подход позволяет существенно экономить время и усилия при выполнении анализов. Особенно широко его стали применять для экспресс-идентификации инфекционных агентов. Например, С. Н. Щелкунов с сотрудниками разработали метод МПЦР, позволяющий при использовании пяти пар праймеров проводить одновременно родо- и видоспецифичную идентификацию ортопоксвирусов, патогенных для человека (рис. 1.31). С помощью мультиплексной ПЦР можно также осуществлять одновременную детекцию множественных инфекционных агентов, обусловливающих схожие клинические проявления.

Полимеразная цепная реакция позволяет амплифицировать также молекулы РНК. На первом этапе с помощью обратной транскриптазы (ОТ) получают ДНК-копию целевой РНК, а затем осуществляют ПЦР. Такая система называется ***ОТ-ПЦР*** (reverse transcription PCR, RT-PCR). Обратные транскриптазы имеют две основные ферментативные активности: ДНК-полимеразную и РНКазы H. Последняя направлена на гидролиз комплексов РНК–ДНК и поэтому значительно снижает эффективность синтеза кДНК *in vitro*. Методами генетической инженерии удалось получить варианты обратной транскриптазы с существенно сниженной активностью РНКазы H и оптимальной активностью для синтеза кДНК.

На основе полимеразной цепной реакции в 1988 г. А. В. Белявский и К. Раевский предложили способ амплификации молекул кДНК *in vitro*. Для того чтобы все молекулы суммарной кДНК могли участвовать в амплификации, необходимо наличие на обоих концах кДНК последовательностей, общих для всех молекул. Это реализуется следующим образом. Синтез первой цепи кДНК инициируется после связыва-

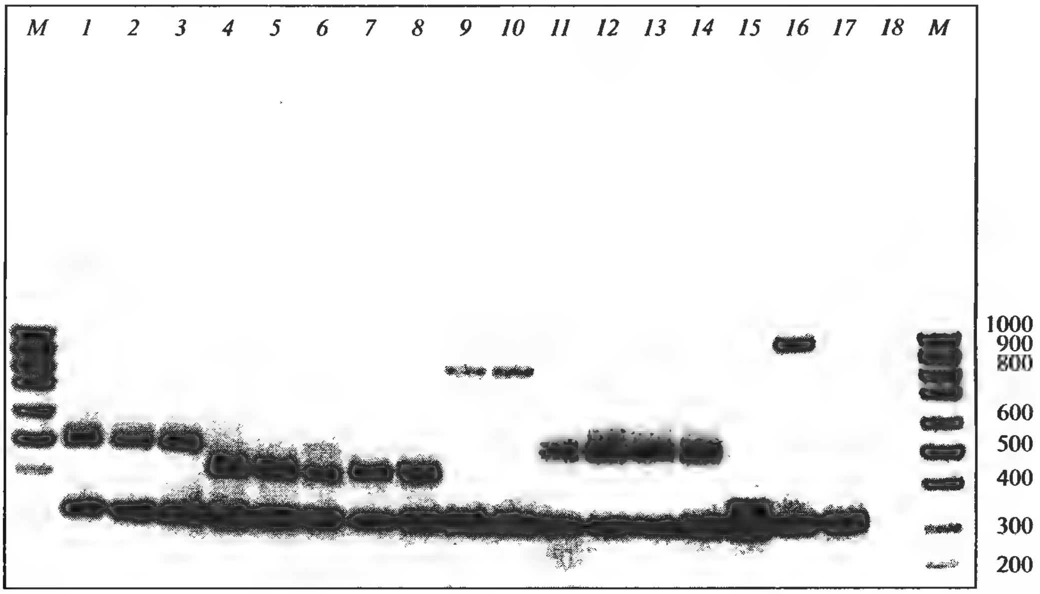


Рис. 1.31. Результат электрофоретического разделения в 2%-ном агарозном геле фрагментов ДНК, полученных после ПЦР с использованием четырех пар олигонуклеотидных праймеров для видоспецифичной и одной пары — для родоспецифичной идентификации ортопоксвирусов:

вирус осповакцины, штаммы Copenhagen (*1*), ЛИВП (*2*), ВР-1 (*3*), Chambon (*11*), EM-63 (*12*), Western Reserve (*13*); вирус оспы коров, штаммы Puma-73 (*4*), GRI-90 (*5*), Turk (*6*), Hamburg (*7*), EP-1 (*8*); вирус оспы обезьян, штаммы Zaire–96-I-16 (*9*), Congo-8 (*10*); вирус оспы кроликов, штамм Utrecht (*14*); вирус натуральной оспы, штаммы Ind-3a (*15*), Butler (*16*); вирус эктромелии (*17*); отрицательный контроль (*18*); ДНК-маркер (*M*). Справа указана длина фрагмента в пн

ния (Т)-праймера с поли(А)-последовательностью матричных РНК (рис. 1.32, *а*). На 3′-конце этого праймера находится последовательность олиго(dT), спаривающаяся с поли(А)-концом мРНК. На 5′-конце (Т)-праймера имеется последовательность, сильно обогащенная остатками G и C и служащая для повышения допустимой температуры отжига праймера во время ПЦР. После синтеза первой цепи кДНК к ее 3′-концу с помощью терминальной трансферазы достраивают олиго(dG)-конец (см. рис. 1.32, *б*). Цепь РНК из полученного дуплекса удаляют щелочным гидролизом, после чего одноцепочечная матрица готова к амплификации.

При амплификации используют два синтетических праймера: (Т)-праймер, служивший для инициации синтеза первой цепи, и (С)-праймер, комплементарный олиго(dG)-концам (см. рис. 1.32, *в*). В первом цикле амплификации участвует только (С)-праймер, который инициирует синтез второй цепи кДНК. При этом синтезируется комплементарная (Т)-праймеру последовательность на 3′-конце второй цепи. Во втором цикле ПЦР участвуют оба праймера. Последующие циклы амплификации приводят к экспоненциальному нарастанию числа копий двухцепочечной кДНК. Данный подход позволяет многократно размножать ДНК-копии матричных РНК, начиная с незначительных исходных количеств. В частности, удается конструировать представительные библиотеки кДНК, полученные на основе мРНК, выделенной всего из нескольких клеток.

ОТ-ПЦР применяют для идентификации РНК-содержащих вирусов. В этом случае используют так называемые генспецифичные праймеры, которые обеспечивают высокую надежность проводимых анализов.

1.8.2. Примеры использования ПЦР

Полимеразная цепная реакция — один из мощнейших инструментов исследования нуклеиновых кислот, не доступный ранее. ПЦР используют для анализа индивидуальных вариаций нуклеотидных последовательностей в определенных локусах, для повышения эффективности клонирования целевых последовательностей изучаемых геномов и их прямого секвенирования, для детекции патогенных микроорганизмов и т. п. Рассмотрим примеры, демонстрирующие возможности метода ПЦР и широкий спектр решаемых с его помощью научных и практических задач.

Метод ПЦР позволил проанализировать наличие последовательностей вирусов папилломы человека в срезах биоптатов новообразований шейки матки человека, залитых парафином и хранившихся в течение 40 лет. Более того, используя ПЦР, удалось амплифицировать и кло-

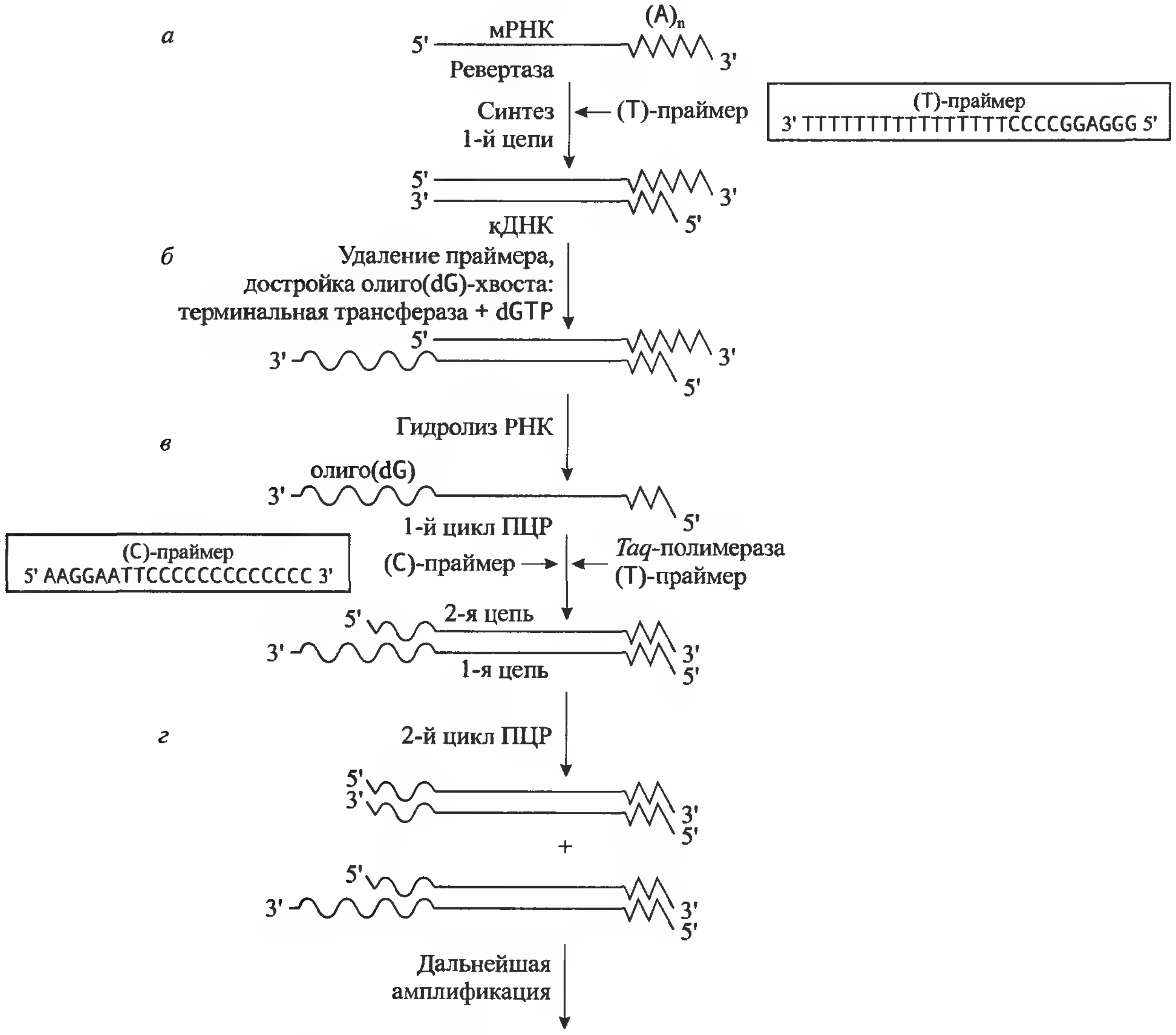


Рис. 1.32. Схема амплификации тотальной кДНК с помощью ПЦР

нировать фрагменты митохондриальной ДНК из ископаемых останков мозга человека возраста 7 тысяч лет! Именно с помощью ПЦР были идентифицированы костные останки российского императора Николая II и членов его семьи, пролежавшие в земле 73 года.

Метод ПЦР обеспечивает уникальную возможность тонкого генетического анализа и изучения хромосомной рекомбинации, ДНК-полиморфизма и др. В частности, показано, что после 50–60 циклов ПЦР, выполненных на ДНК единичных диплоидных или гаплоидных клеток человека, удается надежно определять аллельный тип анализируемого гена в гибридизационном тесте амплифицированной ДНК с аллельспецифичными ^{32}P-меченными олигонуклеотидами. На лизатах индивидуальных сперматозоидов человека продемонстрирована возможность одновременно анализировать два локуса, расположенных на негомологичных хромосомах.

Метод анализа сперматозоидов сразу нашел практическое применение в судебной медицине, так как HLA-типирование гаплоидных клеток позволяет определять отцовство или выявлять преступника. (Комплекс HLA представляет собой набор генов главного комплекса гистосовместимости человека; локусы комплекса HLA — наиболее полиморфные из всех известных у высших позвоночных: в пределах вида в каждом локусе существует необычайно большое число разных аллелей.)

Интересным приложением полимеразной цепной реакции является выявление чужеродных генетических структур, встроенных в заранее определенный район генома изучаемых клеток или вирусов. При интеграции чужеродной ДНК в хромосомный ген эукариотической клетки (или вирусный ген), для которого отсутствуют методы селекции мутантных форм, достаточно сложно доказать правильность встрой-

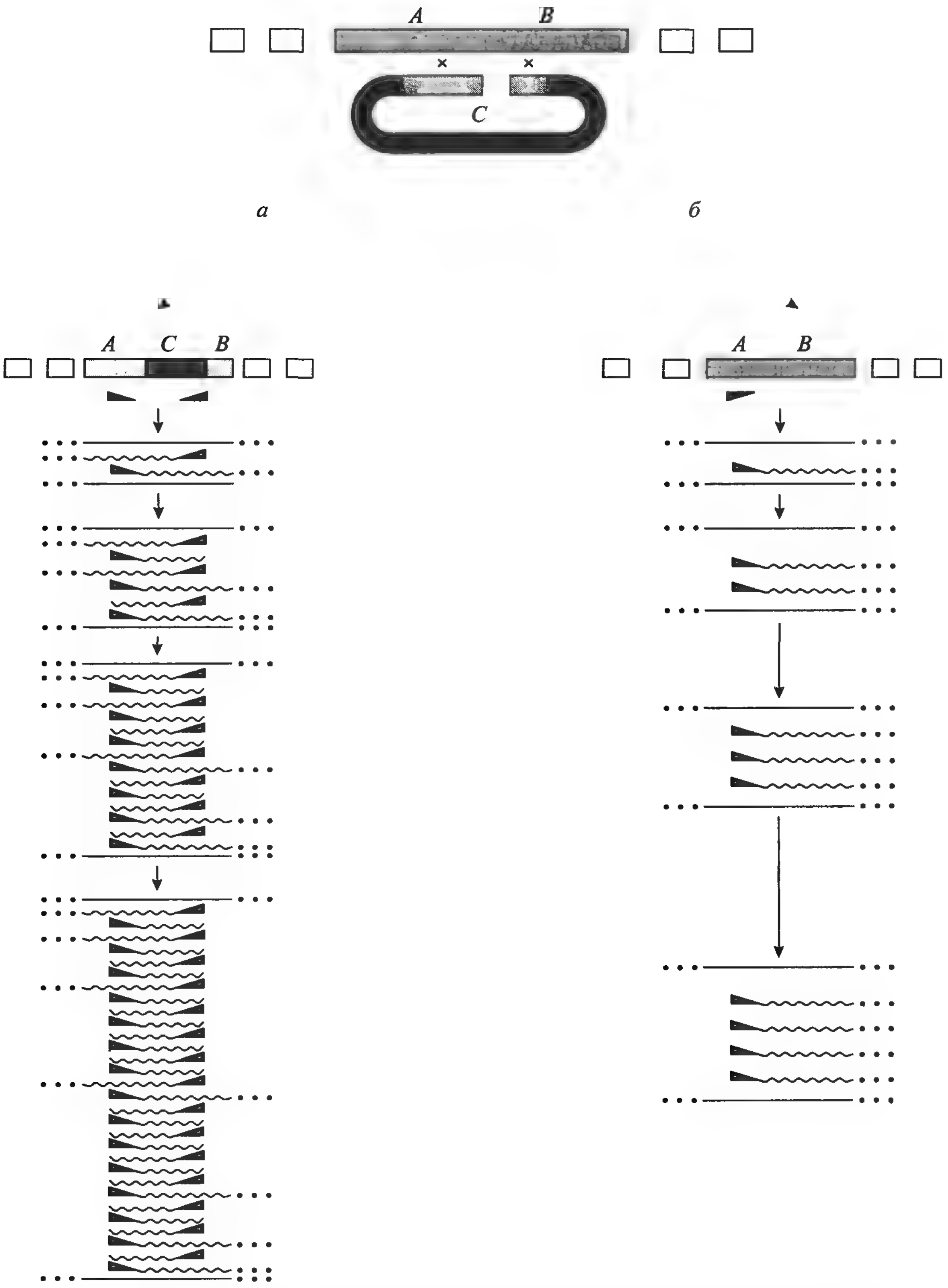


Рис. 1.33. Анализ специфичности рекомбинационной встройки фрагмента ДНК в геном клетки с помощью ПЦР:

а — правильная (заданная) интеграция; *б* — отсутствие правильной интеграции

ки. Данное затруднение удалось преодолеть с помощью ПЦР: суммарная клеточная (или вирусная) ДНК отжигается с двумя олигонуклеотидными затравками, одна из которых комплементарна участку хозяйской ДНК вблизи точки встраивания, а другая — последовательности интегрированного фрагмента в антипараллельной цепи ДНК (рис. 1.33). Полимеразная цепная реакция в случае неизмененной структуры хромосомной ДНК в предполагаемом месте встройки приводит к образованию фрагментов одноцепочечной ДНК неопределенного разме-

*Xho*I
5' *CCCCTCGAG*ATGAGAGTGAAGGAGAAATATCAGCACTTGTGGA 3' Праймер № 1
5'———**ATG**agagtgaaggagaaatatcagcacttgtggagat
agggcttggaaaggattttgcta**TAA**ga*tggg*tggcaagtggtcaaaaagtagtgtggtt 3'
3' CTTTCCTAAAACGAT**ATT**CT*TAAG*ACCGTTCACC 5' Праймер № 2
*Eco*RI

Рис. 1.34. Пример выбора олигонуклеотидных праймеров для амплификации гена *ENV* вируса иммунодефицита человека.

Строчными буквами обозначена последовательность «плюс»-цепи матрицы, прописными — последовательности праймеров: № 1 — в направлении 5′-3′, № 2 — в направлении 3′-5′. Праймеры комплементарны «минус»- или «плюс»-цепи матрицы соответственно. Инициаторный и терминаторный триплеты выделены жирным шрифтом, некомплементарные нуклеотиды матрицы и праймеров обозначены курсивом

ра, а в случае запланированной встройки — двухцепочечных фрагментов ДНК известного размера, определяемого расстоянием между местами отжига двух праймеров (см. рис. 1.33). Степень амплификации анализируемого района генома в первом случае будет находиться в линейной зависимости от количества циклов, а во втором — в экспоненциальной. Экспоненциальное накопление амплифицируемого фрагмента заранее известного размера позволяет визуализировать его после электрофоретического фракционирования препарата ДНК и делать однозначное заключение о встройке чужеродной последовательности в заданный район хромосомной (или вирусной) ДНК.

Таким образом, амплификация последовательностей ДНК *in vitro* находит широкое применение как в экспериментах по клонированию в составе молекулярных векторов, так и для прямого анализа вариантных состояний генов. Особое значение рассмотренный методический подход имеет при разработке простых тест-систем для выявления в организме нуклеиновых кислот инфекционных агентов. В настоящее время такие анализы стали рутинными. Многочисленные фирмы производят тест-системы для идентификации методом ПЦР (или ОТ-ПЦР) практически всех известных микроорганизмов, вызывающих заболевания человека и животных. В частности, этот подход используют для ранней диагностики наличия в организме вируса иммунодефицита человека (HIV), что не удается осуществить другими методами. При этом не требуется работать с радиоактивными изотопами, так как амплифицированный сегмент вирусной ДНК выявляется напрямую после электрофоретического разделения фрагментов ДНК и окраски их бромистым этидием.

Использование ПЦР для клонирования заданных фрагментов ДНК. Появление метода ПЦР значительно упростило процедуру точного извлечения из состава молекул ДНК известных нуклеотидных последовательностей и встройки их в молекулярные векторы. Могут быть рассчитаны последовательности олигонуклеотидных праймеров, которые обеспечивают не только точную амплификацию требуемого фрагмента, но и одновременно позволяют вводить участки гидролиза определенных рестриктаз (рис. 1.34), необходимые для запланированной встройки в клонирующий вектор. При этом количество исходной ДНК, содержащей целевую последовательность, может быть очень малым.

Олигонуклеотидные микрочипы. В 1988 г. группой ученых Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, руководимой А. Д. Мирзабековым, была инициирована разработка олигонуклеотидных микрочипов (microchip), иначе называемых олигонуклеотидными микроматрицами (microarray). Целью этого исследования была разработка метода, позволяющего секвенировать короткие фрагменты ДНК путем гибридизации с олигонуклеотидами известной последовательности, которые иммобилизованы на твердом носителе в строго определенном порядке (это и называется микроматрицей или микрочипом).

В дальнейшем благодаря созданию специального оборудования удалось роботизировать процесс получения микрочипов с нанесением в строго определенном порядке микроколичеств олигонуклеотидов или фрагментов ДНК (кДНК) на твердый носитель (обычно используют стекло, нейлоновые мембраны, силиконовые поверхности и др.). Это позволило созда-

вать микроматрицы, содержащие на поверхности в несколько квадратных сантиметров сотни и тысячи индивидуальных проб для последующей гибридизации. Препараты ДНК, предназначенные для гибридизации на микрочипе, флуоресцентно метят, обычно в процессе ПЦР. После гибридизации и отмывки микрочип анализируют с помощью лазерного сканера и данные флуоресценции каждой ячейки микроматрицы подвергают компьютерной обработке, используя специальное программное обеспечение.

Секвенирование многочисленных кДНК и полных геномов все расширяющегося спектра организмов создало базу для получения микрочипов, позволяющих одновременно изучать экспрессию большого числа генов на уровне целого генома. Первую работу данного направления выполнили М. Шен с сотрудниками (1995 г.), создав микрочип на основе амплифицированных в ПЦР фрагментов кДНК для 48 генов растения *Arabidopsis thaliana.* Из листьев и корней растений выделяли суммарную мРНК, флуоресцентно метили в реакции обратной транскрипции и гибридизовали с созданным микрочипом. Результаты анализа продемонстрировали, что экспрессия изученных генов в листьях и корнях одного и того же растения различается (рис. 1 на цв. вклейке).

В дальнейшем различается были созданы микроматрицы с нанесенными в строгом порядке образцами ПЦР-фрагментов кДНК для сотен и тысяч известных генов человека и других организмов. Часто создают специализированные микроматрицы для анализа экспрессии определенных типов генов: контролирующих клеточный цикл, апоптоз, сплайсинг, трансляцию, синтез цитокинов, комплемента, факторов свертывания крови, факторов транскрипции и др. Например, Т. Шенк с сотрудниками (1998 г.), используя четыре микрочипа, содержащих в сумме фрагменты кДНК для 6600 генов человека, изучили на первичной культуре фибробластов кожи человека, как инфицирование цитомегаловирусом человека влияет на экспрессию этих генов. Оказалось, что данная вирусная инфекция достоверно изменяет (увеличивает или уменьшает) экспрессию 258 генов.

Другая группа ученых на основе данных секвенирования ДНК цитомегаловируса человека создала в 1999 г. микрочип, используя фрагменты длиной 75 нуклеотидов, соответствующие всем теоретически предсказанным открытым рамкам трансляции. Для 151 вирусной ОРТ была доказана продукция специфических мРНК и выявлено время их биосинтеза в процессе инфекции.

С. Гуера с соавторами (2003 г.) с помощью микроматриц, содержащих 15 тыс. кДНК человека, изучили картину изменения экспрессии генов перевиваемой линии клеток человека HeLa в процессе инфекции их вирусом осповакцины. Было обнаружено, что вирусная инфекция приводит к активации экспрессии 66 генов клетки и к репрессии 1267 генов.

Используя синхронизованную линию фибробластов из эмбриона мыши, С. Ишида с соавторами (2001 г.) идентифицировали 188 генов, участвующих в регуляции разных этапов клеточного цикла. Показано, что 65 из них регулируются транскрипционным фактором E2F (рис. 2 на цв. вклейке).

А. Вант Воут с соавторами (2003 г.) исследовали экспрессию 271 гена клеток человека в условиях инфицирования их вирусом гриппа типа А, вирусом иммунодефицита человека, а также под действием интерферона или теплового шока. Оказалось, что каждое воздействие поразному отражается на экспрессии данных генов (рис. 3 на цв. вклейке). В то же время обнаружено сходство в регуляции экспрессии ряда генов при инфекции клеток вирусом гриппа и под влиянием интерферона, что указывает на важность интерферонового ответа при заражении данным вирусом.

Технология ДНК-микрочипов дает в руки экспериментаторов мощный инструмент для анализа функционирования генов не только в системе *in vitro*, но и в живом организме в зависимости от различных физиологических и патологических состояний. Так, К. Бигер с соавторами (2001 г.) в течение 14 недель прижизненно изучали экспрессию многочисленных генов в печени шимпанзе, инфицированной вирусом гепатита С и болеющей гепатитом в острой форме. Материала игольной биопсии было достаточно для выделения суммарной мРНК, мечения флуоресцентным красителем ДНК-копий и гибридизации на микрочипе, содержащем кДНК набора генов человека.

Технология ДНК-микрочипов является чрезвычайно многообещающей для использования в диагностической практике в целях идентификации инфекционных агентов и различных неинфекционных заболеваний. В перспективе будут созданы микроматрицы для одновременного выявления большинства известных инфекционных агентов (вирусов, бактерий, простейших и т. п.). Другими методами проведение такого экспресс-анализа невозможно.

1.9. БЛОТТИНГ ПО САУЗЕРНУ

При анализе разделенных электрофорезом молекул ДНК широкое распространение получил метод переноса нуклеиновых кислот из агарозных гелей на нитроцеллюлозную бумагу, разработанный Е. Саузерном в 1975 г.; в отечественной литературе его принято называть блоттингом по Саузерну (от англ. blotting — промокание). Сначала молекулы ДНК (или их фрагменты), разделенные по размерам электрофорезом в пластинах агарозного геля, денатурируют щелочью, после нейтрализации щелочи пластину геля покрывают листом нитроцеллюлозы. На нитроцеллюлозу помещают стопку листов фильтровальной бумаги, которая обеспечивает медленный ток буферного раствора через гель в направлении, перпендикулярном направлению электрофореза (рис. 1.35). ДНК диффундирует из геля и связывается с нитроцеллюлозным фильтром. После прогревания фильтра при температуре 80 °C в вакууме ДНК необратимо иммобилизуется на нитроцеллюлозе. При этом расположение полос иммобилизо-

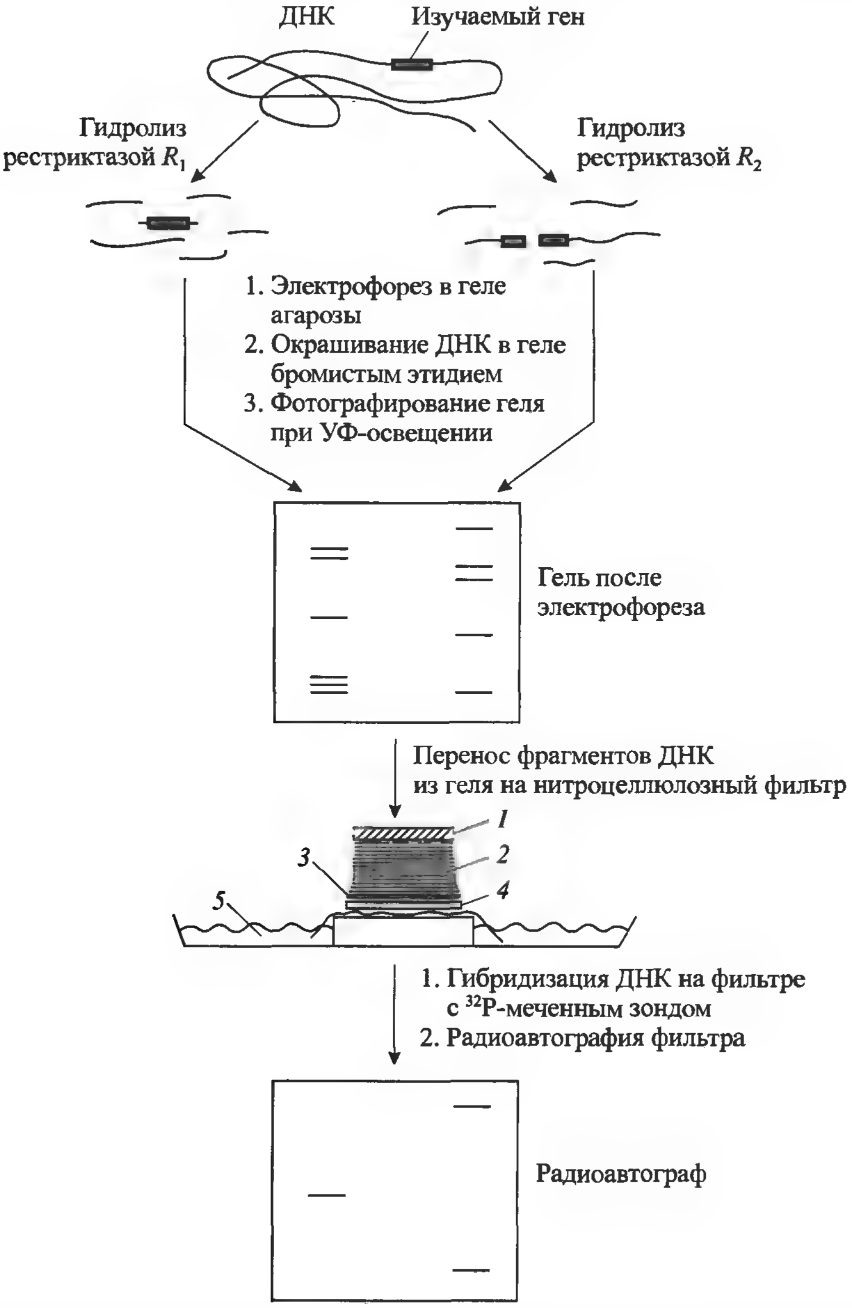


Рис. 1.35. Схема метода переноса фрагментов ДНК на нитроцеллюлозную бумагу по Саузерну: *1* — груз; *2* — фильтровальная бумага; *3* — нитроцеллюлозный фильтр; *4* — гель; *5* — буферный раствор

ванной ДНК точно соответствует их расположению в геле.

ДНК, связанную с фильтром, можно гибридизовать с радиоактивно меченным зондом, специфичным к определенной последовательности. В качестве такого зонда можно использовать клонированный фрагмент ДНК, синтетический олигонуклеотид, РНК или ее ДНК-копию. Меченый зонд гибридизуется с ДНК, содержащей комплементарные ему последовательности (см. рис. 1.35). Полосы гибридизовавшейся ДНК выявляются после радиоавтографии нитроцеллюлозного фильтра.

Блоттинг по Саузерну является исключительно полезным методом для установления локализации генов в фрагментах, полученных после гидролиза различными рестриктазами гибридных молекул ДНК, хромосомных ДНК и т. п. В частности, данный подход обеспечивает возможность предварительно исследовать полиморфизм определенных генетических локусов по длинам соответствующих рестрикционных фрагментов ДНК. Кроме того, с помощью гибридизации по Саузерну можно легко выяснить, имеет ли целевой ген участок гидролиза определенной рестриктазой в своей внутренней части, что позволяет выбирать оптимальную стратегию клонирования изучаемого района генома.

По аналогичной схеме из агарозного геля на нитроцеллюлозный фильтр можно перенести и молекулы РНК. Этот метод был назван Северным блоттингом (Northern blotting) в противоположность блоттингу по Саузерну (Southern blotting), так как фамилия Саузерн в английском языке означает «южный». Перенос на фильтры из геля белков соответственно назвали Западным блоттингом (Western blotting).

1.10. ИММУНОБЛОТТИНГ

В общем смысле под иммуноблоттингом понимают анализ смеси белков, перенесенных на твердую подложку-мембрану, с которой они связываются ковалентными связями, с последующей иммунодетекцией. Анализировать можно смесь белков, непосредственно нанесенную на подложку, — ***дот-блот анализ*** (от англ. dot — пятнышко) — либо после ее предварительного фракционирования методами электрофокусирования, диск-электрофореза или двумерного электрофореза — ***Вестерн-блот анализ*** (Western blotting). Такая методология применяется также для отбора клонов бактерий, фагов или вирусов, экспрессирующих продукты целевых клонированных генов. Перенос белков на мембрану осуществляется либо пассивно, либо с использованием аппаратуры для электропереноса. На эффективность переноса белков на мембрану влияет множество факторов, таких как молекулярная масса белков, пористость геля, время переноса и состав используемого буферного раствора (транс-буфера). В зависимости от задач и условий проведения эксперимента подбираются условия переноса, обеспечивающие наилучшие результаты.

В качестве подложек обычно используют нитроцеллюлозные, поливинилидендифлуоридные (ПВДФ) или положительно заряженные нейлоновые мембраны.

Нитроцеллюлоза может связывать до 80–100 мкг белка на 1 см^2. Низкомолекулярные белки (с молекулярной массой менее 20 кДа) могут быть утеряны в результате промывок после электропереноса, что снижает чувствительность, однако использование глутарового альдегида для фиксации белков или нитроцеллюлозы с мелкими порами (0,2 мкм) значительно снижает эти потери. Крупные белки (более 100 кДа), денатурированные в растворе додецилсульфата натрия (SDS), могут слабо переноситься на мембрану, если в транс-буфере присутствует этанол. Спирт значительно улучшает перенос белков с SDS-полиакриламидного геля, но сужает поры в геле, что и приводит к задержке крупных белков. Мембрана ПВДФ оптимизирована для проведения иммунодетекции и способна удерживать специфически связавшиеся белки до 160 мкг/см^2 при очень низком уровне неспецифического связывания. Немаловажное свойство этой мембраны — возможность ее многократного использования. Нейлоновые мембраны Zeta-Probe эффективно связывают SDS-белки в отсутствие спирта, причем это связывание устойчиво к последующим обработкам. Низкомолекулярные белки также удерживаются эффективно. Благодаря высокой связывающей емкости — около 480 мкг белка на 1 см^2 — мембраны Zeta-Probe позволяют обнаруживать следовые количества белка в анализируемых смесях.

После того как антиген оказывается иммобилизованным на мембране, оставшиеся центры связывания блокируют растворами желатина, либо бычьего сывороточного альбумина, либо обезжиренного молока. Затем мембрану инкубируют в растворе поликлональных или моноклональных антител к исследуемому анти-

гену. После отмывки несвязавшихся антител мембрану инкубируют в растворе вторичных антител, которые представляют собой конъюгат ферментов щелочной фосфатазы (alkaline phosphatase, AP) или пероксидазы хрена (horseradish peroxidase, HRP) с антивидовыми антителами (козьи антитела к иммуноглобулинам кролика, мыши или человека) либо белками A (белок *Staphyloccocus aureus*) или G (белок *Streptococcus* sp.), имеющими высокую аффинность к Fc-области иммуноглобулинов. Детекцию образованных иммунных комплексов проводят химическим или хемилюминесцентным способом.

Субстратами для химической реакции при использовании конъюгатов щелочной фосфатазы служат 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат (BCIP) или тетразолий голубой (NBT), а при использовании конъюгатов пероксидазы хрена — 4-хлор-1-нафтол и перекись водорода. В результате ферментативных реакций на мембране образуется окрашенная полоса или пятно в месте локализации комплекса антиген–антитело. Чувствительность данного метода составляет 100 пг белка при использовании конъюгатов AP и 100–500 пг при использовании конъюгатов HRP.

Хемилюминесцентная детекция иммунных комплексов позволяет определять менее 5 пг антигена. Принцип этого метода заключается в том, что при реакции HRP с перекисью водорода и циклическим диацилгидразинлюминолом происходит эмиссия света длиной волны 428 нм, которая может быть зафиксирована на светочувствительной пленке.

1.11. РАЗДЕЛЕНИЕ ЭЛЕКТРОФОРЕЗОМ ГИГАНТСКИХ МОЛЕКУЛ ДНК

Обычный вариант гель-электрофореза не позволяет разделять фрагменты ДНК, размер которых превышает 50 тпн. Данное затруднение удалось преодолеть после того, как в 1984 г. был разработан метод гель-электрофореза с пульсирующим полем (pulsed field gel electrophoresis, PFGE), называемый также ***пульс-электрофорезом***. Показано, что если с некоторой частотой менять определенным образом направление электрического поля, то молекулы ДНК размером до 10 млн (!) пн приобретают способность переориентироваться и проходить через поры в обычном агарозном геле. Гель помещается в ячейку, имеющую форму шестиугольника, на каждой стороне которого расположено 4 электрода (рис. 1.36). Периодическое изменение направления вектора электрического поля под углом 120° обеспечивает возможность разделения гигантских молекул ДНК. Например, у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* данным методом можно разделить все 16 хромосом, которые имеют размеры от 0,2 до 2,2 млн пн.

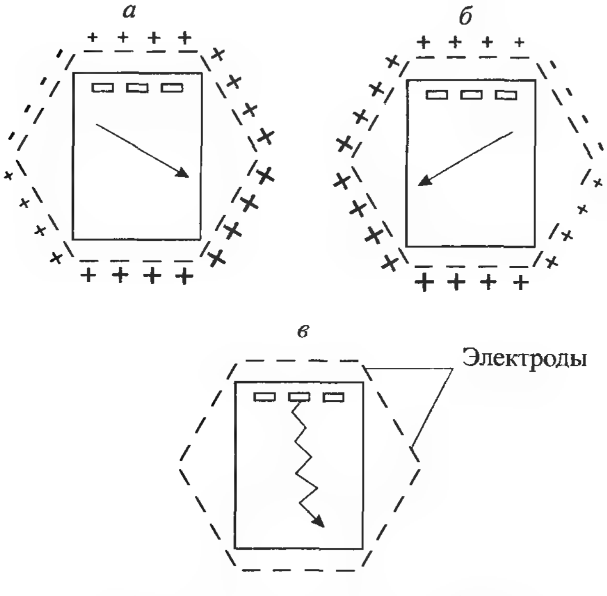


Рис. 1.36. Система пульс-электрофореза, разработанная фирмой Bio-Rad Lab.

С помощью электроники на 24 электрода подаются потенциалы таким образом, что вектор электрического поля имеет направление либо *а*, либо *б*; *в* — средний вектор электрического поля, получаемый в процессе электрофореза

Пульс-электрофорез явился новым мощным методом изучения молекулярной организации гигантских ДНК. Редкощепящие рестриктазы, узнающие последовательность из 8 пн (*Not*I, *Sfi*I, см. табл. 1.2), гидролизуют ДНК, как правило, с образованием очень крупных фрагментов, которые удается разделить только с помощью пульс-электрофореза. Эти фрагменты можно переносить из геля на нитроцеллюлозные фильтры по Саузерну. Для этого ДНК фрагментируют в геле, облучая ультрафиолетом после окраски бромистым этидием или расщепляя химически.

Объединение пульс-электрофореза с блоттингом по Саузерну позволяет картировать гены, анализировать перестройки в хромосомах, выявлять интеграцию чужеродных последовательностей в определенные хромосомы, изучать библиотеки клонированных крупных фрагментов ДНК и т. п. Все это обеспечивает новый, более высокий уровень молекулярно-генетического исследования различных организмов.

1.12. МЕТОДЫ ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНОГО СИНТЕЗА ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫХ ФРАГМЕНТОВ ДНК

В настоящее время, после завершения программы «Геном человека», тысячи неизвестных ранее белков стали доступными для изучения. Чтобы выяснить их биологическую роль, необходимо экспрессировать соответствующие гены и выделить рекомбинантные белки. Проще всего использовать для этой цели последовательности природных генов, полученных, например, с помощью ПЦР или из геномных библиотек. Однако такой подход часто не приводит к желаемому результату при экспрессии чужеродных генов в гетерологичной системе, например в *E. coli* или дрожжах. Такие осложнения связаны с высоким содержанием GC-пар в природных генах, использованием разных кодонов в различных системах экспрессии, сложной интрон-экзонной структурой генов. Эти проблемы могут быть решены с помощью химико-ферментативного синтеза генов.

При планировании структуры гена можно заранее предусмотреть необходимые участки узнавания рестриктаз, что облегчит манипулирование с целевым геном, учесть особенности микроорганизма, в котором предполагается осуществить его экспрессию, выбрав наиболее подходящие для этого кодоны, избавиться как от нежелательных инвертированных повторов, ведущих к формированию вторичных структур мРНК, так и от прямых повторов, способствующих внутримолекулярной рекомбинации.

Искусственные ДНК в настоящее время превратились в эффективный инструмент молекулярной биологии. Они находят широкое применение:

- при создании белков с улучшенными свойствами;
- введении необходимых мутаций в гены;
- конструировании химерных белков (например, путем комбинирования функциональных доменов различных белков для создания ферментов с новыми каталитическими свойствами или специфичностью);
- конструировании генетических структур, позволяющих проводить простые генно-инженерные манипуляции благодаря наличию в ДНК заранее запланированных рестрикционных сайтов.

Существуют различные методические подходы к синтезу искусственных генов.

1.12.1. Метод Кораны

Методология получения искусственных протяженных фрагментов ДНК нерегулярного строения была впервые предложена Г. Кораной в начале 1970-х гг. С первых шагов его исследования стало ясно, что разработать процедуру полностью химического синтеза достаточно протяженных цепей ДНК вряд ли удастся. Поэтому был предложен метод, сочетающий химический синтез нуклеиновых кислот с принципом комплементарности оснований ДНК.

Реализовать данный подход удалось благодаря использованию ДНК-лигазы, позволяющей ковалентно присоединять друг к другу синтезированные химическим путем олигонуклеотиды в комплементарных комплексах (рис. 1.37).

Ковалентное присоединение происходит в том случае, когда два смежных участка одного олигонуклеотида (3) комплементарны крайним фрагментам других олигонуклеотидов (1 и 2), которые благодаря комплементарным взаимодействиям укладываются на первом как на матрице. При этом концы их фиксируются так, что их положение максимально благоприятно для образования ковалентной фосфодиэфирной связи. После того как лигаза соединит эти два конца, образуется двунитевая ДНК-подобная структура, состоящая из олигонуклеотидов 3 и 4. Соединения 3 и 4 выделяют и используют для даль-

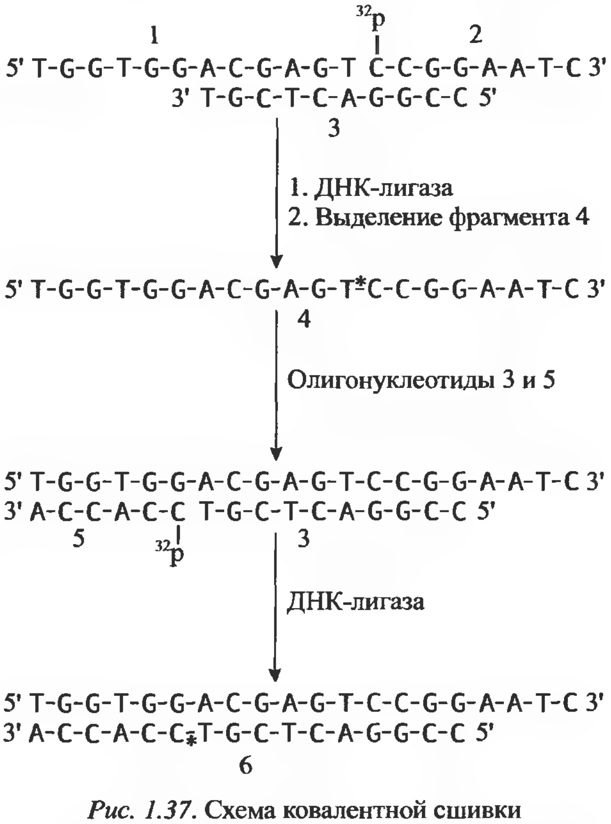


Рис. 1.37. Схема ковалентной сшивки олигонуклеотидов в комплементарном дуплексе

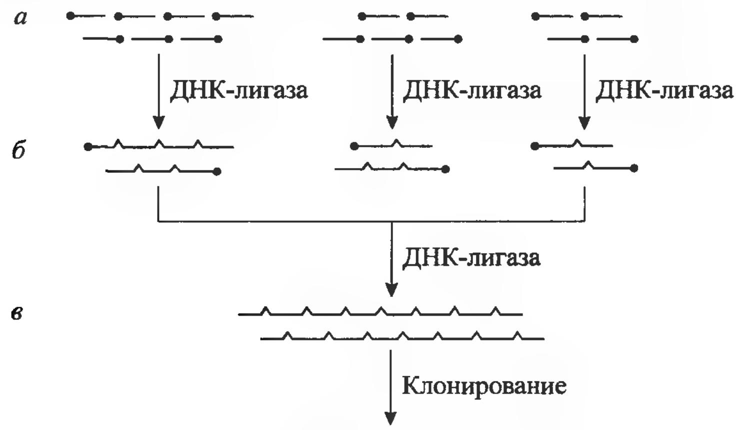


Рис. 1.38. Схема химико-ферментативного синтеза ДНК по Коране:

а — синтетические олигомеры; *б* — дуплексы-интермедиаты; *в* — целевой фрагмент двухцепочечной ДНК. Черным кружком обозначен 5′-концевой фосфат

нейшего наращивания полинуклеотидной цепи. Аналогично к олигонуклеотиду 3 можно присоединить олигонуклеотид 5, используя в качестве матрицы синтезированный олигонуклеотид 4.

Места ковалентных сшивок, а следовательно, и строение полученных олигонуклеотидов определяют методом ближайших соседей. Для этого 5′-концевые фосфатные группы олигонуклеотидных фрагментов метят изотопом ^{32}P (например олигонуклеотиды 2 и 5, см. рис. 1.37). Полученные в результате лигазной реакции олигонуклеотиды (например, 4 и 6) после выделения и очистки подвергают полному гидролизу под действием фосфодиэстеразы и определяют, какой из нуклеотидов содержит ^{32}P. Меченая фосфатная группа окажется у 3′-концевого мономера олигонуклеотида, к которому под действием ДНК-лигазы был присоединен 5′-концевой фосфат второго олигонуклеотида, и таким образом будет определено место сшивки. Если, например, при подобной обработке олигонуклеотидов 4 и 6 метка ^{32}P окажется связанной с тимидином, то это однозначно подтвердит правильность присоединения исходных фрагментов.

Стратегия синтеза двунитевых фрагментов ДНК по Коране состоит из следующих этапов:

1. Химический синтез олигонуклеотидов, соответствующих обеим целевым нитям. Олигонуклеотиды должны содержать свободные концевые 3′- и 5′-гидроксильные группы. Фрагменты, принадлежащие к противоположным цепям, должны перекрываться.

2. Фосфорилирование 5′-гидроксильных групп с помощью [γ-^{32}P]ATP в присутствии полинуклеотидкиназы. Наличие метки значительно облегчает анализ и выделение промежуточных продуктов.

3. Конденсация в присутствии ДНК-лигазы трех или большего числа олигонуклеотидов. Для этого олигонуклеотиды с перекрывающимися комплементарными последовательностями смешивают в условиях, оптимальных для образования двунитевого дуплекса.

4. Конденсация дуплексов с выступающими одноцепочечными последовательностями на концах в целевой ген.

5. Клонирование целевого гена в векторной молекуле.

Успех рассматриваемого метода в значительной мере определяется правильным разбиением целевой структуры на дуплексы-интермедиаты и составляющие их олигонуклеотиды (рис. 1.38). Главное требование к такому разбиению сформулировано Г. Кораной в основополагающей работе по синтезу гена предшественника супрессорной тирозиновой тРНК *E. coli*: в пределах одного олигонуклеотида и в выступающих концах дуплексов-интермедиатов не должно быть самокомплементарных участков. Установлено, что наличие олигомеров с такими участками (рис. 1.39) затрудняет образование дуплексов, а в ряде случаев вообще препятствует их получению.

Однако это ограничение не является единственным. Выход целевой двухцепочечной структуры является произведением выходов промежуточных дуплексов. Если выход дуплексов-интермедиатов низкий, при конструировании протяженной ДНК не получается достаточно материала для клонирования. Поэтому конденсация олигонуклеотидов является ключевой стадией синтеза ДНК по методу Кораны. Проведение ее часто затрудняется из-за образова-

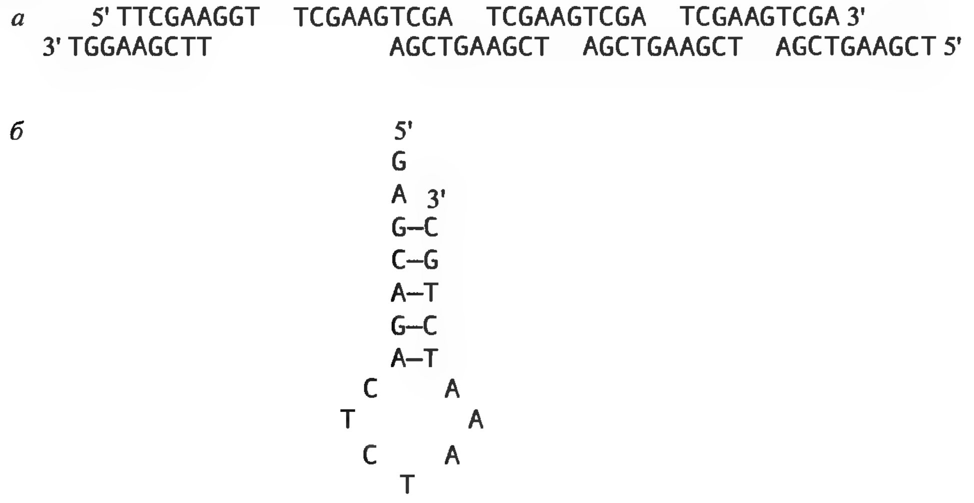


Рис. 1.39. Примеры самокомплементарного взаимодействия:
а — олигонуклеотидов; *б* — одной из цепей дуплекса после сшивки олигомеров

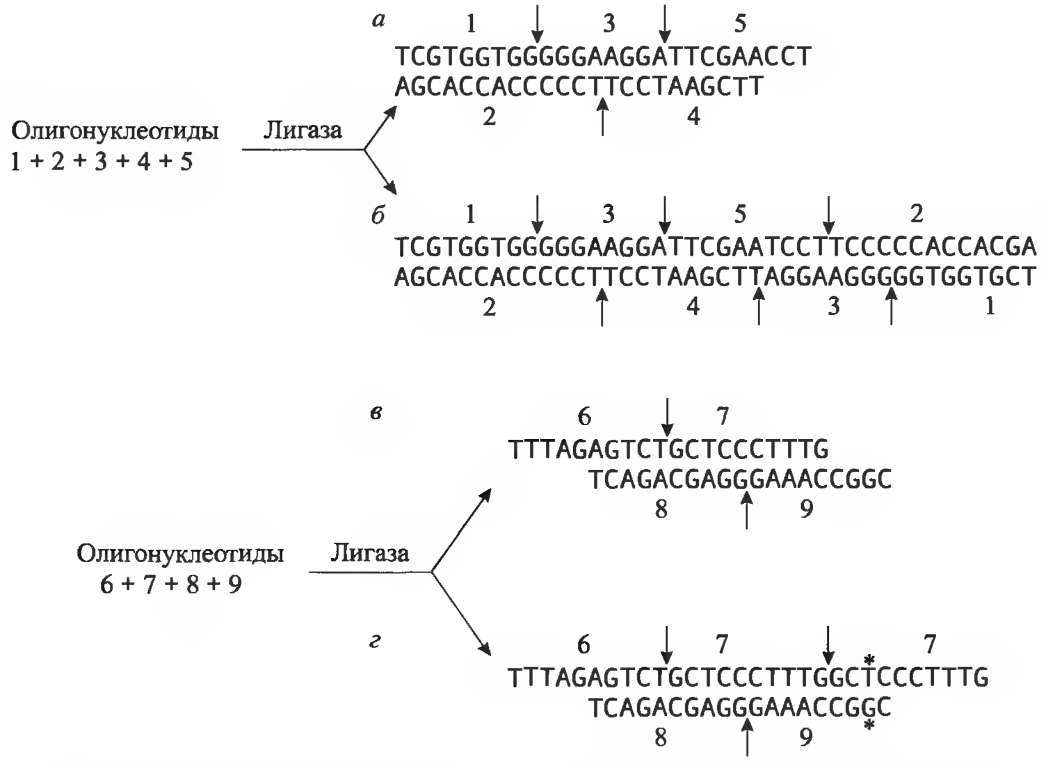


Рис. 1.40. Примеры образования целевых (*а*, *в*) и непродуктивных (*б*, *г*) комплексов.
Стрелками отмечено разбиение на олигонуклеотиды

ния многочисленных побочных продуктов, возникающих в результате конкурентного комплементарного взаимодействия между олигомерами и из-за формирования непродуктивных комплексов, содержащих неканонические пары GT, AC, TC.

Особенно наглядно проявлялись эти осложнения в ранних работах при использовании коротких олигонуклеотидов, синтезированных диэфирным методом. Для конструирования гена предшественника супрессорной тирозиновой тРНК применялись олигонуклеотиды длиной не более 15 звеньев. Поэтому, например, при получении первого блока этого гена наряду с целевым комплексом *а* образовывался «неправильный» комплекс *б*, являвшийся причиной появления значительного количества побочных продуктов (рис. 1.40). При получении дуплекса *в* из другого блока этого гена были обнаружены побочные продукты — производные конкурентно образующегося комплекса *г*, содержащего в своем составе TG-пару.

```
EcoRI Met Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys Stop BamHI
          ↓                 ↓                 ↓
5' AATTCATGGCTGGTTGTAAGAACTTCTTTTGGAAGACTTTCACTTCGTGTTGATAG 3'
       GTACCGACCAACATTCTTGAAGAAAACCTTCTGAAAGTGAAGCACAACTATCCTAG
                 ↑                 ↑                 ↑
```

Рис. 1.41. Структура синтезированного гена соматостатина.
Стрелками указано разбиение на олигонуклеотиды

В ряде случаев из-за подобных затруднений приходилось изменять схему конструирования целевого гена. Поэтому при планировании эксперимента, особенно с использованием коротких олигонуклеотидов, необходимы тщательный расчет структуры олигонуклеотидов, состава дуплексов-интермедиатов и экспериментальная проверка возможности реализации схемы конструирования.

В 1976 г. Г. Кораной с сотрудниками был осуществлен первый химико-ферментативный синтез полного гена — гена супрессорной тРНК^{Tyr}. Синтезированный 207-членный дуплекс включал, кроме структурного гена предшественника тРНК^{Tyr}, промоторный участок и последовательность нуклеотидов, содержащую сигнал для процессинга первичного транскрипта до функциональной тРНК. Фрагмент был снабжен липкими концами для встраивания по участкам гидролиза эндонуклеазой *Eco*RI.

Полученный химико-ферментативным путем ген супрессорной тРНК^{Tyr} был встроен в плазмиду ColE1 и специально сконструированный на основе бактериофага λ вектор Харон 3А. После трансформации *E. coli* рекомбинатной ДНК, несущей синтетический ген, наблюдали супрессию амбер-мутаций в обоих случаях, что указывает на правильный процессинг предшественника тРНК *in vivo* в зрелую форму супрессорной тРНК^{Tyr}.

Клонированный ген был также транскрибирован *in vitro,* при этом полученный продукт после обработки грубым экстрактом *E. coli* превратился в предшественника супрессорной тРНК^{Tyr}. Эти факты свидетельствуют о том, что искусственный ген имеет заданную структуру природного гена супрессорной тРНК^{Tyr}, его экспрессия контролируется синтетическим промотором и, следовательно, целевой ген является функционально активным.

Полученный группой Г. Кораны результат трудно переоценить. Фактически из этой работы выросла в дальнейшем практическая генная инженерия.

Синтез функционально активного гена супрессорной тирозиновой тРНК, а также структурного гена аланиновой тРНК является выдающимся достижением того времени. Любое вмешательство химического синтеза в молекулярную биологию было событием исключительным не только по эффекту, но и по трудоемкости: средняя скорость наращивания олигонуклеотидной цепи фосфодиэфирным методом составляла всего несколько звеньев в месяц. Олигонуклеотидный синтез был искусством, требовавшим высокой химической квалификации и почти противоестественного трудолюбия.

Г. Корана синтезировал гены, ориентируясь на известную первичную последовательность тРНК. Параллельно другими исследователями были начаты работы по синтезу генов пептидов и белков. Так, в 1975 г. Х. Кёстер и сотрудники сконструировали ген, кодирующий пептидный гормон ангиотензин II. Нуклеотидная последовательность была определена исходя из известной аминокислотной последовательности ангиотензина II.

Синтезированный ген включал участок инициации трансляции (ATG) и два стоп-кодона. Один из стоп-кодонов располагался перед структурным геном, что, по замыслу авторов, должно было обеспечить начало трансляции. Эта работа не получила развития из-за неудачных попыток встроить полученный ген в плазмиду.

Через два года группа американских ученых осуществила синтез второго искусственного гена пептидного гормона — соматостатина (рис. 1.41). Кодоны, соответствующие каждой аминокислоте, были выбраны исходя из первичной структуры пептида не произвольным образом, а с учетом частоты их встречаемости в геноме фага MS2. Синтезированный дуплекс содержал на 5′-конце кодирующей цепи триплет метионина (для направленного расщепления полипептида в этой точке после трансляции) и имел последовательности, соответствующие липким концам, образуемым рестриктазами *Eco*RI и *Bam*HI. Ген соматостатина был введен в специально сконструированную плазмиду в участок гена β-галактозидазы. Таким об-

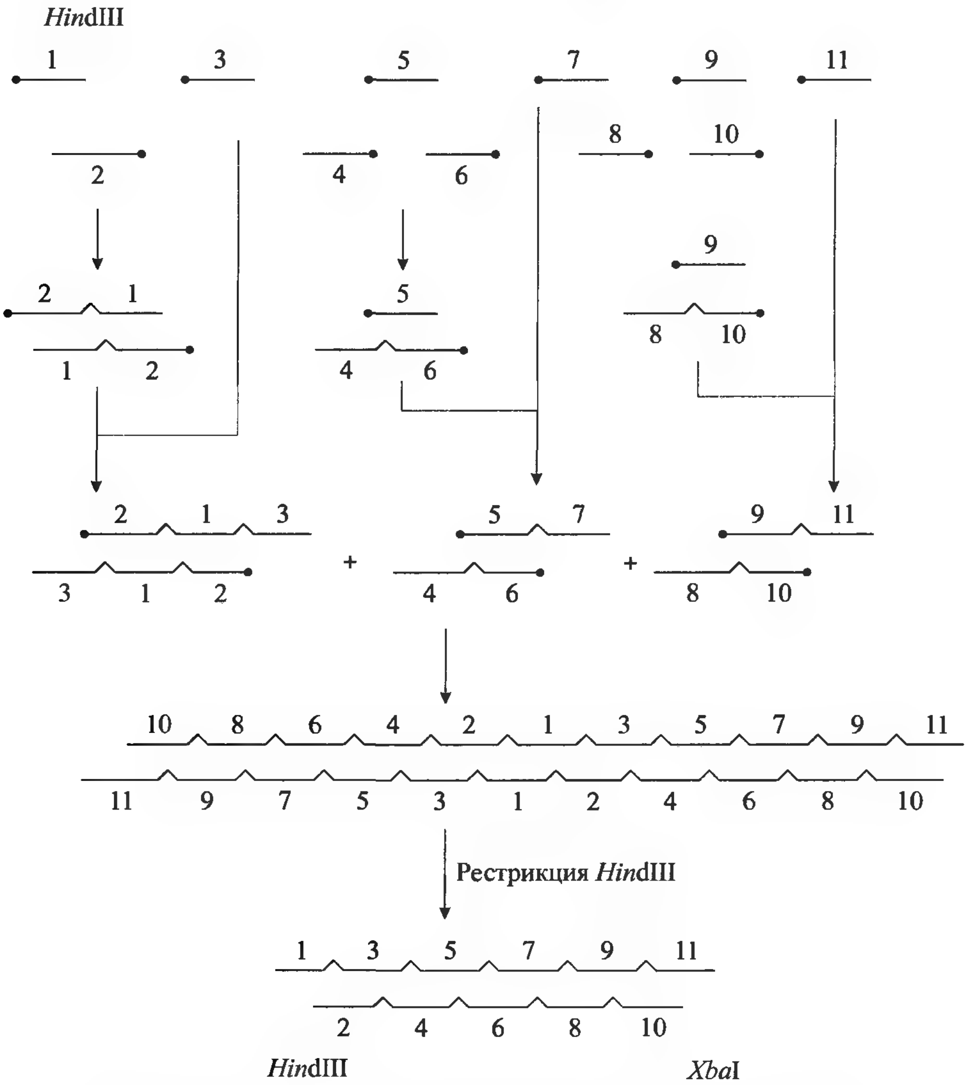


Рис. 1.42. Фрагмент схемы сборки гена эпидермального фактора роста

разом, для регуляции синтетического гена был использован β-галактозный оперон.

Следующим шагом в развитии методов химического синтеза генов стало создание специализированных компьютерных программ, которые позволят оптимизировать структуру олигонуклеотидов, чтобы свести к минимуму образование комплексов, приводящих к появлению побочных продуктов. Одним из первых примеров использования такой программы для выявления самокомплементарных и повторяющихся последовательностей оснований служит работа по синтезу гена эпидермального фактора роста, предназначенного для экспрессии в клетках *E. coli*. Целевой ген, кодирующий 53 аминокислоты, был разбит на 23 олигонуклеотида. На рис. 1.42 приведен фрагмент составленной с помощью ЭВМ схемы последовательной сборки целевой ДНК из 17 промежуточных блоков-интермедиатов, каждый из которых был выделен в индивидуальном состоянии. Несмотря на очевидную громоздкость, схема последовательного лигирования олигонуклеотидных блоков обеспечивала преимущественное образование «правильных» комплексов.

В этой работе использовался остроумный прием, позволяющий избежать образования побочных продуктов. Он заключался в синтезе симметричных димеров целевых блоков-дуплексов. Центром симметрии в каждом случае выступали участки узнавания рестриктаз, имеющиеся в последовательности синтетического фрагмента. Это позволило устранить возможность образования «неправильных» комплексов благодаря запланированным самокомплементарным последовательностям половинных сайтов эндонуклеаз рестрикции. Целевые блоки-интермедиаты получали путем гидролиза соответствующими рестриктазами.

Сложность схем конструирования искусственных фрагментов ДНК с многократным выделением промежуточных дуплексов — неизбеж-

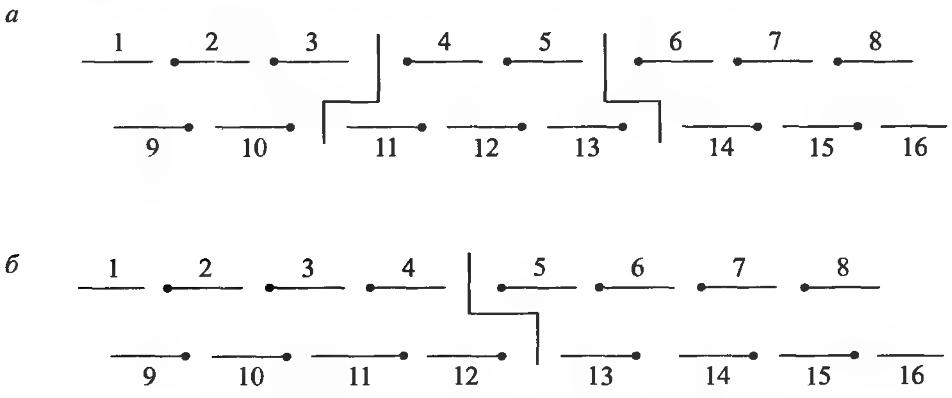


Рис. 1.43. Альтернативные способы сборки гена VIP:
а — из трех промежуточных блоков; *б* — из двух промежуточных блоков

ное следствие использования коротких олигонуклеотидов. Получить протяженный дуплекс из коротких олигомеров даже при условии тщательного расчета его структуры трудно. На примере синтеза гена вазоактивного кишечного пептида (VIP), кодирующего 28 аминокислот, изучались различные схемы конструирования целевого фрагмента ДНК из 16 олигонуклеотидов длиной 8–14 звеньев (рис. 1.43). Целевую структуру получали из двух промежуточных блоков-дуплексов, из трех промежуточных блоков, а также одновременным лигированием всех 16 олигонуклеотидов. Наименьший выход целевого дуплекса с одновременным образованием большого количества побочных продуктов отмечен в последнем случае.

Полезным методическим приемом, позволяющим получать из коротких олигонуклеотидов достаточно гомогенный препарат ДНК, является раздельная «сшивка» верхней и нижней цепей (рис. 1.44). Таким образом можно избежать ошибочного лигирования (из-за образования неправильных комплексов), особенно в тех случаях, когда ДНК обладает элементами симметрии. Двустадийное получение дуплексов было успешно использовано при синтезе промотора p_{25} фага T5, генов, кодирующих белок VP1 вируса ящура, человеческий интерферон $\alpha 2$, антигенную детерминанту поверхностного антигена вируса гепатита B, ангиогенин и Val^8-кальцитонин.

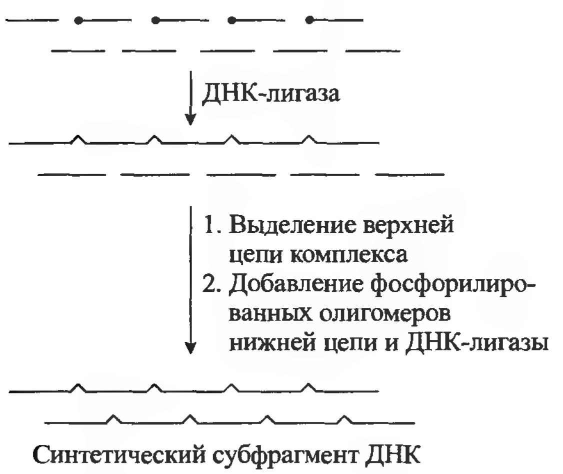


Рис. 1.44. Раздельная «сшивка» цепей субфрагмента ДНК.
Черным кружком обозначен 5′-концевой фосфат

С разработкой триэфирного метода трудоемкость получения искусственных олигонуклеотидов значительно снизилась, и синтез олигомера постепенно превратился из экстраординарного в тривиальное событие. Принципиальное значение имели также появление технологии синтеза на полимерном носителе, заимствованной из химии пептидов и белков, и автоматизация процесса. Благодаря этому стало возможным почти целиком доверить получение олигонуклеотидов автоматическому синтезатору ДНК. Триэфирный метод позволил получать более длинные олигомеры (15–20 нуклеотидных звеньев), что привело к повышению стабильности комплексов из-за большего перекрывания олигонуклеотидов и дало возможность получать дуплексы-интермедиаты из большего числа олигомеров. Все это способствовало созданию значительно более протяженных генов при использовании прежней методологии.

Одним из первых генов, сконструированных по такой технологии, является ген человеческого IFN-$\alpha 2$ (рис. 1.45). Синтез выполнен в три этапа: 1) образование малых дуплексов длиной 30–45 пн из 68 синтетических олигонуклеотидов; 2) получение более протяженных субфрагментов I, II и III из соответствующих малых; 3) образование полной копии гена из субфрагментов.

При увеличении числа олигонуклеотидов, вводимых в реакцию лигирования на стадии об-

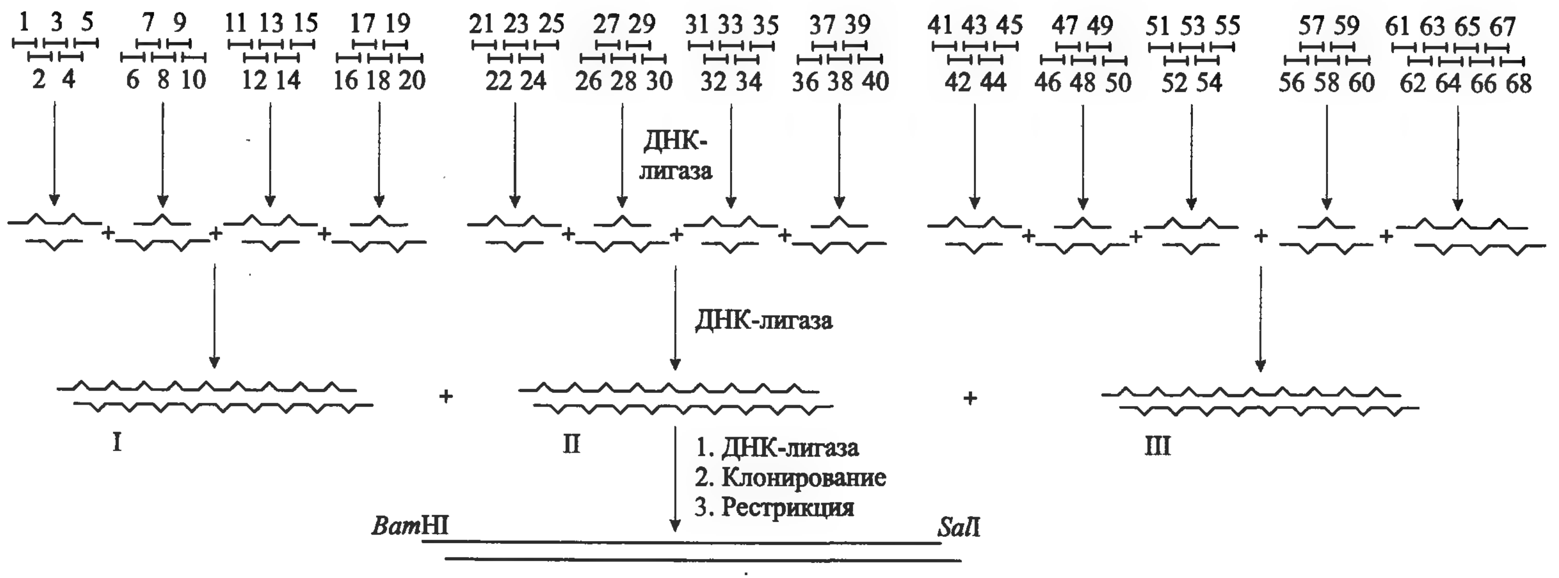


Рис. 1.45. Схема конструирования искусственного гена IFN-α2. Места лигирования олигонуклеотидов обозначены изломами линий

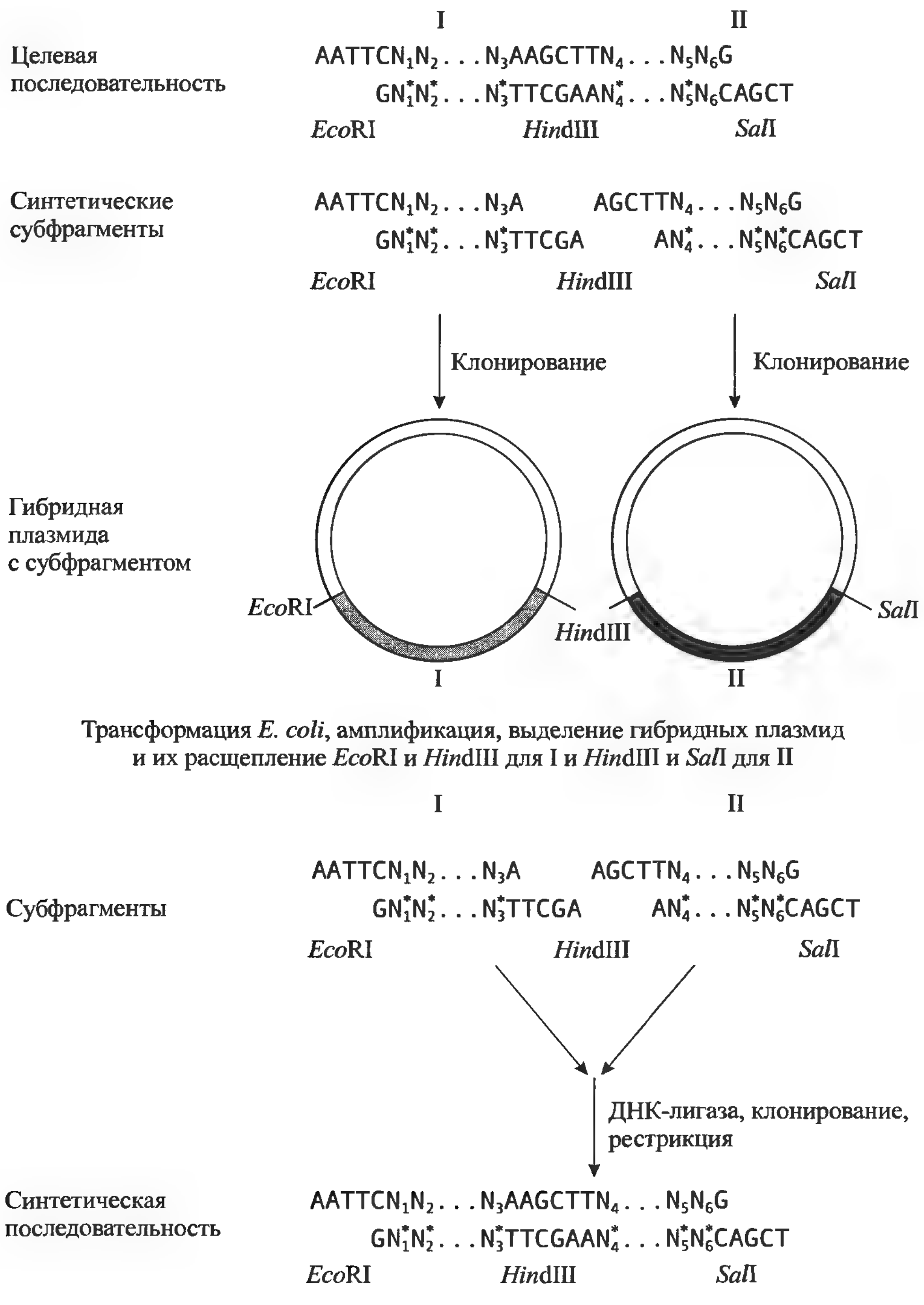


Рис. 1.46. Конструирование искусственной ДНК с промежуточным клонированием: N_i, N_i^* — комплементарные основания

разования коротких дуплексов, схема конструирования протяженного фрагмента ДНК несколько упрощается. Так, при синтезе гена соматотропина (192 аминокислотных остатка, АК) на первом этапе было получено только 8 блоков-дуплексов, каждый из которых состоял из 6–14 олигонуклеотидов. Однако в этом случае из-за сложности реакционной смеси образуются побочные продукты реакции лигирования и выход как отдельных блоков-интермедиатов, так и целевой структуры оказывается очень низким.

По аналогичной схеме был получен ряд больших генов, таких как гены S-белка рибонуклеазы А (104 АК), человеческого лизоцима (130 АК), РНКазы Т1 (101 АК), кальмодулина (149 АК), анафилатоксина С5а (80 АК), интерлейкина 2 (133 АК), различных факторов роста. Вместе с тем низкий выход блоков-интермедиатов и целевого дуплекса ДНК, большая трудоемкость метода вынуждали искать дальнейшие пути его совершенствования. Одним из способов, увеличивающих надежность схемы полу-

Рис. 1.47. Конструирование временных сайтов

чения искусственных фрагментов ДНК в рамках метода Кораны, является введение стадии клонирования промежуточных дуплексов (рис. 1.46). Это позволяет избежать потерь нуклеотидного материала, очистить его от побочных продуктов реакции лигирования и наработать в достаточном количестве. Введение стадии клонирования промежуточных блоков несколько усложняет схему получения целевых генных структур, но этот недостаток в значительной мере компенсируется экономией времени и материалов при наработке дуплексов ДНК. Примером могут служить работы по синтезу генов проинсулина, А- и В-цепей зрелой формы инсулина человека.

Для успешного клонирования субфрагментов синтетического гена они должны быть фланкированы участками узнавания подходящих эндонуклеаз рестрикции. Эти участки должны быть уникальными как для самого гена, так и для клонирующего вектора. Удобнее всего использовать сайты, уже имеющиеся в последовательности нуклеотидов синтезируемой ДНК, однако чаще всего они или отсутствуют, или их недостаточно. В этом случае применяют различные линкеры (адаптеры), но тогда при расщеплении рекомбинантной молекулы происходит не регенерация клонированной ДНК, а образование нового фрагмента, отличающегося от исходного наличием дополнительных нуклеотидов, привнесенных линкером.

Для удаления этих лишних нуклеотидов (что необходимо при сборке субфрагментов в целевую ДНК) приходится использовать специальные приемы. Одним из них является модульный метод, предложенный Ю. А. Овчинниковым с сотрудниками. Метод основан на применении временных сайтов уникальных эндонуклеаз рестрикции, которые вводятся в последовательность гена в произвольно выбранные места, содержащие любой самокомплементарный динуклеотид: AT, TA, CG или GC. При этом последовательность гена раздвигается и внутрь динуклеотида вводятся нуклеотиды, формирующие в этом месте уникальный участок рестрикции (рис. 1.47). Для удаления дополнительного рестрикционного сайта синтезированную ДНК расщепляют соответствующей рестриктазой, затем выступающие одноцепочечные последовательности удаляют нуклеазой S1 и полученные тупые концы молекулы соединяют с помощью ДНК-лигазы фага Т4 (рис. 1.48).

В целом модульный принцип конструирования протяженных ДНК включает в себя три стадии:

1) получение модулей химико-ферментативным способом;

2) индивидуальное клонирование каждого модуля в подходящем векторе;

3) сборка целевой последовательности ДНК в специализированных векторах, содержащих большой набор уникальных сайтов рестрикции (рис. 1.49).

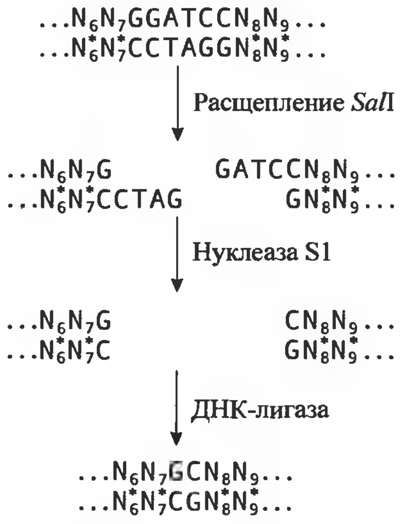


Рис. 1.48. Удаление временного сайта

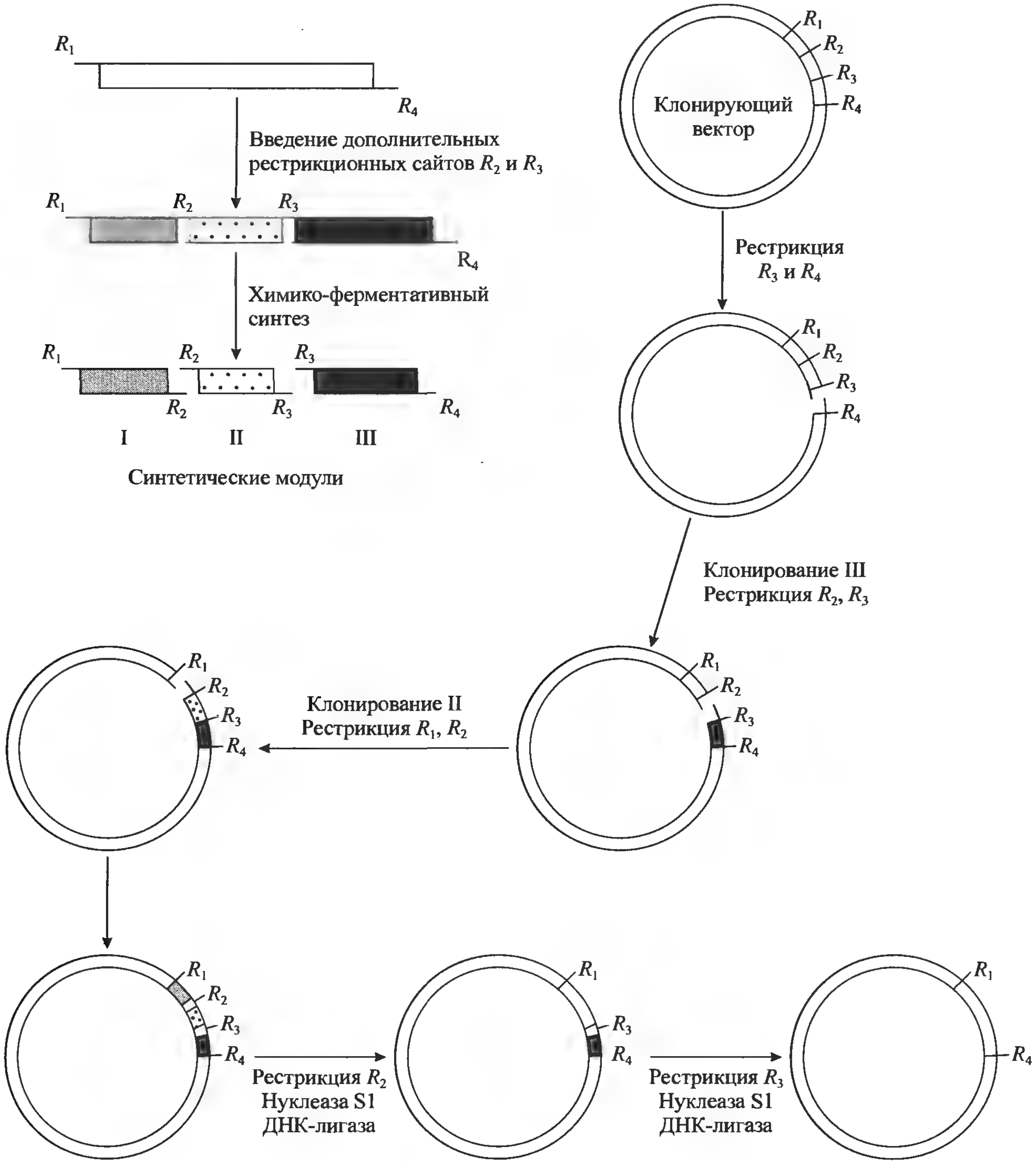


Рис. 1.49. Модульный способ сборки искусственного гена с использованием временных рестрикционных сайтов:

R_i — нуклеотидная последовательность рестрикционного сайта

Использование промежуточного клонирования повышает надежность схемы синтеза генов и позволяет легко получать их аналоги путем замены одних фрагментов другими.

Дальнейшее совершенствование способов химико-ферментативного конструирования фрагментов нуклеиновых кислот обусловлено применением для синтеза олигонуклеотидов фосфамидного и фосфитного методов, использующих высокореакционные соединения трехвалентного фосфора. Благодаря этому скорость синтеза и его эффективность резко возросли: цикл наращивания одного нуклеотидного звена занимает всего несколько минут, а суммарный выход олигомера приближается к количественному.

По существу технология синтеза больше не нуждается в усовершенствовании, исправно по-

ставляя молекулярным биологам неограниченное число олигонуклеотидов заданной структуры. Ничто не характеризует современную ситуацию в олигонуклеотидном синтезе так ярко, как то, что для его проведения теперь не требуется большого опыта в области химического эксперимента. Новые методы позволили стабильно получать молекулы длиной в несколько десятков оснований. Применение столь длинных полинуклеотидов в методе Кораны привело к значительному упрощению схем конструирования протяженных фрагментов ДНК. Наглядно это видно на примере синтеза гена эпидермального фактора роста для экспрессии его в дрожжах. Ген был получен из 12 олигомеров длиной от 12 до 59 нуклеотидных звеньев. В отличие от рассмотренной ранее схемы (см. рис. 1.42), потребовавшей выделения 17 промежуточных блоков-дуплексов, в данном случае оказалось достаточным провести лигирование в трех промежуточных комплексах.

Вследствие более значительного перекрывания полинуклеотидов, чем олигонуклеотидов, лигазные комплексы обладают большей стабильностью, что в ряде случаев позволяет получать целевые гены одностадийной ферментативной реакцией. Так, гены пептида III, активирующего рост соединительной ткани (85 АК), и убиквитина (76 АК) были получены одностадийным лигированием 20 полинуклеотидов длиной от 28 до 32 нуклеотидных звеньев и 8 полинуклеотидов длиной от 50 до 64 нуклеотидных звеньев соответственно. В первом случае успех был обусловлен, кроме всего прочего, применением специальной программы Repeat для поиска непродуктивных комплексов. Путем вариации кодонов в последовательности гена пептида III было предотвращено образование «неправильных» комплексов, в которых возможно взаимодействие 8 и более пар оснований.

Применение полинуклеотидов в сочетании с промежуточным клонированием субфрагментов позволило Г. Коране с сотрудниками синтезировать один из самых протяженных искусственных фрагментов ДНК — ген бычьего родопсина общей длиной 1057 пн. В этой работе использовали 72 олиго- и полинуклеотида длиной от 15 до 40 нуклеотидных звеньев. Весь ген был разбит на три субфрагмента: PB (345 пн), XP (364 пн) и FX (335 пн), при сборке которых применялась обычная стратегия. Структура олигомеров выбиралась таким образом, чтобы липкие концы промежуточных дуплексов не были самокоплементарными. Общий выход субфрагментов был мал и составил для PB 4 %, для XP и FX — по 1 %. Успешное получение целевого гена при столь низком выходе субфрагментов-интермедиатов свидетельствует скорее об экспериментальном мастерстве авторов, чем о возможности широкого применения этого метода для синтеза протяженных генов. Аналогично из полинуклеотидов с промежуточным клонированием субфрагментов был получен ген прохимозина быка.

Для преодоления «неправильного» комплексообразования и избавления от необходимости очистки промежуточных субфрагментов при синтезе искусственных генов методом Кораны предложена последовательная сборка ДНК на твердой матрице (рис. 1.50). Нерастворимый носитель с присоединенным к нему стартовым олигонуклеотидом последовательно обрабатывают небольшим молярным избытком фосфорилированных по 5′-концу олигонуклеотидов. Перед добавлением очередного олигомера избыток предыдущего отмывается. По окончании процесса комплексообразования проводят сшивку дуплекса и отщепление его от носителя. Затем дуплекс клонируют в необходимом векторе.

Для отщепления дуплекса от твердого носителя либо разрушают ковалентную связь стартового олигомера с носителем, либо расщепляют его по заранее введенным сайтам рестрикции. Если стартовый олигомер не связан ковалентно с остальной последовательностью (в том случае, когда ближайший к нему олигонуклеотид не был фосфорилирован или между ними была специально оставлена небольшая брешь), препарат ДНК подвергают кратковременному нагреванию, достаточному для отщепления, но не полной денатурации ДНК. Примером использования этой стратегии может служить синтез генов ингибитора трипсина из молозива коровы и β-эндорфина.

Для привязки стартового олигонуклеотида к носителю разработаны различные спейсеры (рис. 1.51).

Широкого распространения этот метод конструирования ДНК не получил.

Несмотря на то, что метод Кораны в принципе прост, на практике возникает ряд осложнений, приводящих к ошибкам при синтезе целевого гена. Например, для того чтобы снизить ошибки при синтезе олигонуклеотидов, последние должны быть достаточно коротки, в то же время ДНК-дуплексы в местах перекрывания олигонуклеотидов должны быть прочны, чтобы обеспечить правильную сборку цепи. Необходимо избегать образования любых неправильных

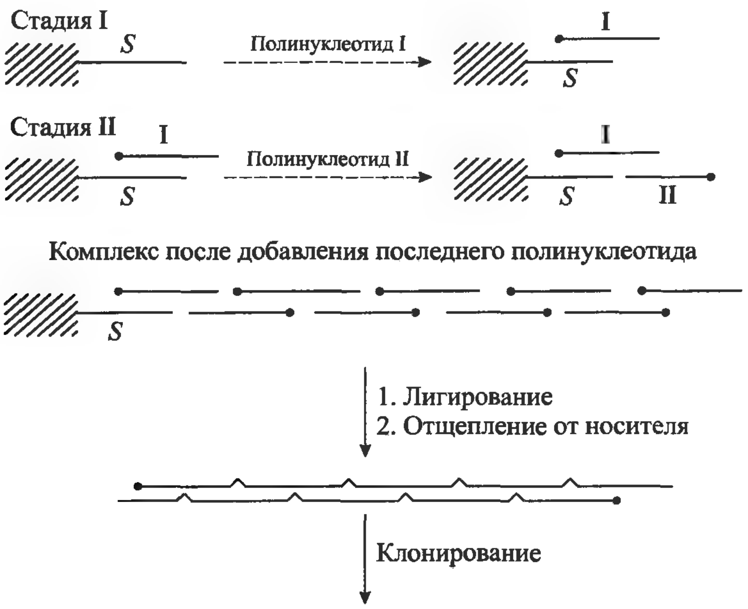


Рис. 1.50. Схема твердофазного конструирования искусственной ДНК.
S — стартовый олигонуклеотид, присоединенный к твердому носителю.
Черным кружком обозначен 5′-концевой фосфат

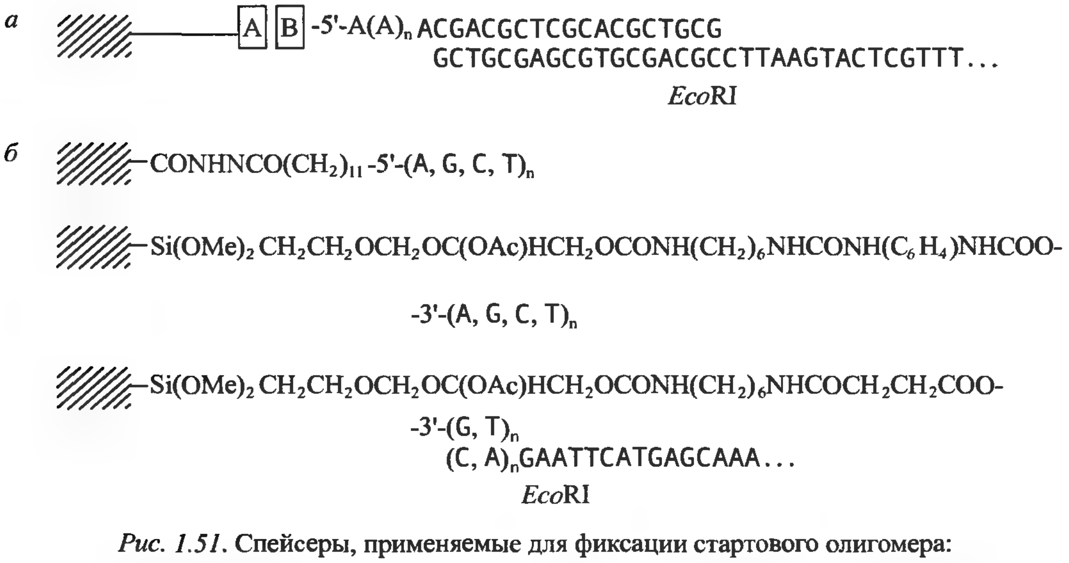


Рис. 1.51. Спейсеры, применяемые для фиксации стартового олигомера:
а — с нековалентным взаимодействием олигонуклеотида, несущего на 5′-конце биотин (В), и содержащего авидин (А) носителя; *б* — позволяющие осуществлять твердофазный синтез стартового олигомера. Заштрихованный прямоугольник — твердый носитель (латекс, стекло, полимер); (A, G, C, T)$_n$ — стартовый олигонуклеотид

вторичных структур. Поэтому для больших белков с кодирующей частью гена более 300 пн процесс планирования синтеза гена является довольно трудоемким. Для его автоматизации создана электронная программа DNA Works (рис. 1.52).

Исходными данными для работы программы являются:

- аминокислотная последовательность целевого белка;
- фланкирующие последовательности, необходимые для непосредственного клонирования искусственного гена;
- температура плавления перекрывающихся фрагментов олигонуклеотидов (обычно составляет 58–70 °С);
- предполагаемая система экспрессии (микроорганизм).

Программа рассчитывает структуру олигонуклеотидов, содержащих оптимизированные кодоны для данной системы экспрессии, выбирает структуру соседних олигонуклеотидов таким образом, чтобы температура плавления дуплексов, образованных свисающими концами, была одинаковой.

R V G Y I E L D L N S G K I L E S F R P

↓ Обратная трансляция

5'...CGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCC... 3'
3'...GCTCACCCACTGTAGCTTGACCTAGAGTTGTCGCCATTCTAGGAACTCTCAAAAGCGGGG... 5'

↓ Разбиение на сегменты

5'...CGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCC... 3'
3'...GCTCACCCACTGTAGCTTGACCTAGAGTTGTCGCCATTCTAGGAACTCTCAAAAGCGGGG... 5'

↓ Оптимизация

5'...CGAGTGGGTTACATCGAACTCGACCTCAACAGCGGCAAGATCCCTTAGAGTTTTCGCCCC... 3'
3'...GCTCACCCAATGTAGCTTGAGCTGGAGTTGTCGCCGTTCTAGGGAATCTCAAAAGCGGGG... 5'

↓ Генерация олигонуклеотидов

5'...CGAGTGGGTTACATCGAACTCGAC... 3'
5'...CTCAACAGCGGCAAGATCCCTTA... 3'
5'...GGGGCGAAAACTCTAAGGGATCTTG... 3'
5'...CCGCTGTTGAGGTCGAGTTCGAT... 3'

Рис. 1.52. Алгоритм работы программы DNA Works

Таблица 1.7. **Синтетические гены, полученные с помощью программы DNA Works**

Ген	Длина, пн	Средняя температура плавления, °C	Число олигонуклеотидов	Средняя длина олигонуклеотида	Число клонов с правильной структурой гена/всего	Всего секвенировано, пн	Число мутаций			Число ошибок	
							Делеции	Вставки	Замены	на клон	на 1000 пн
*hBD*1	139	60	6	40	3/5	695	2	0	1	0,60	4,3
*hBD*2	154	62	10	37	3/3	462	0	0	0	0	0
*hBD*3	166	52	10	32	8/8	1328	0	0	0	0	0
hMCP-4	300	56	12	38	3/5	1500	2	0	2	0,80	2,7
hMCP-5	330	65	14	44	1/3	990	1	0	4	1,67	5,1
*hCCL*27	351	64	16	42	1/2	702	0	0	1	0,50	1,4
HLT	360	64	16	42	0/3	1080	1	1	1	1,00	2,8
vIL-8	365	58	18	36	3/5	1825	2	0	2	0,80	2,2
LPP	756	56	46	32	0/2	1512	2	0	0	1,00	1,3
PPP	771	58	40	38	1/1	771	0	0	0	0	0
*hCXCR*4	1042	67	44	47	1/1	1140	0	0	0	0	0

Данная программа опробована на примере синтеза 11 пептидов и белков, кодируемых генами длиной от 139 до 1042 пн (табл. 1.7).

Число нуклеотидных ошибок в синтезированных генах в основном зависит от качества олигонуклеотидов (количества ошибок), а не от точности копирования ДНК-полимеразой. Например, Pfu-полимераза в ПЦР делает примерно 6,5 ошибки при копировании 100 тыс. пн. Средняя ошибка синтеза искусственных генов с использованием этого фермента составляет 1,8 на 1000 пн. Не обнаружено зависимости между количеством ошибок в структуре искусственных генов и длиной используемых олигонуклеотидов или целевого гена. Так, более длинные гены (*PPP* и *hCXCR*4) были получены без единой ошибки, в то время как более короткие (*hBD*1, *hMCP*-5 и *HLT*) содержат многочисленные ошибки.

В настоящее время DNA Works, по-видимому, является лучшей программой для планирования синтеза искусственных генов по методу Кораны.

Синтез искусственных фрагментов ДНК методом Кораны в настоящее время является широко используемым инструментом молекулярной биологии.

Высшим достижением химического синтеза является проведенный группой Э. Виммера синтез полиовирусной кДНК, из которой был получен инфекционный вирус. Полная последовательность кДНК полиовируса первого типа (Mahoney) вместе с промоторной областью полимеразы фага Т7 была разбита на три фрагмента (3026, 1895 и 2682 пн). Фрагменты были собраны из полинуклеотидов средней длиной 69 нуклеотидных звеньев. После сборки целевой последовательности и ее транскрипции были получены полноценные вирусные частицы.

1.12.2. Конструирование ДНК-дуплексов из частично комплементарных полинуклеотидов

Альтернативный методу Кораны способ конструирования искусственных протяженных фрагментов ДНК сформулирован в работе К. Итакуры с сотрудниками. В его основе лежит способность некоторых ферментов, в частности фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I, достраивать комплементарную цепь в присутствии праймера. Это свойство фермента эпизодически использовалось в рамках метода Кораны для удлинения олигонуклеотидов, в более поздних работах — для получения ДНК-дуплексов.

Получение ДНК из частично комплементарных полинуклеотидов по Итакуре включает в себя следующие этапы (рис. 1.53):

1) химический синтез нескольких попарно частично комплементарных полинуклеотидов;

2) попарный отжиг полинуклеотидов и образование комплекса вследствие комплементарного взаимодействия 10–13 пар оснований, сформированных на 3′-концах полимеров;

3) ферментативная достройка полученного комплекса до полного дуплекса с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I;

4) формирование выступающего липкого конца с одной стороны двухцепочечного дуплекса путем гидролиза соответствующей рестриктазой по заранее введенному в состав фрагмента сайту;

5) клонирование полученных дуплексов с последующей амплификацией в составе плазмиды и выделение целевого фрагмента ДНК с помощью тех же рестриктаз.

Впервые этот подход был использован для синтеза ДНК, кодирующей С-концевую область человеческого интерферона $\alpha 2$. По аналогичной схеме был получен ген эглина С (рис. 1.54).

Рассматриваемый метод требует меньшего числа полинуклеотидов, чем метод Кораны, вследствие чего на 30–40 % снижаются затраты на химический синтез и анализ олигомеров. В этом методе значительно меньше стадий, поэтому он не столь трудоемок и, по-видимому, более надежен по сравнению с методом Кораны. Кроме того, при использовании полинуклеотидов длиной до 40 нуклеотидных звеньев нет необходимости в компьютерном анализе. Вероятно, это связано с достаточной стабильностью образующихся комплексов из-за большей длины области комплементарного взаимодействия полимеров и способности ДНК-полимеразы «проходить» низкоэнергетические шпильки.

При получении протяженных фрагментов ДНК методами Итакуры и Кораны возникает задача упрощения стыковки отдельных клонированных субфрагментов. С этой целью разработаны специальные векторы pMB123, pMB124, pFH123, pFH124, сконструированные на основе плазмид pUR222 и pUC18. Они содержат полилинкеры, включающие набор участков узнавания рестриктаз *Sal*I, *Acc*I, *Hin*dII, *Hin*dIII и *Bam*HI между попарными сайтами эндонуклеаз рестрикции *Fok*I и *Hga*I противоположной полярности (рис. 1.55). Полилинкерный фрагмент расположен в кодирующей последовательности α-пептида β-галактозидазы. Эндонуклеаза

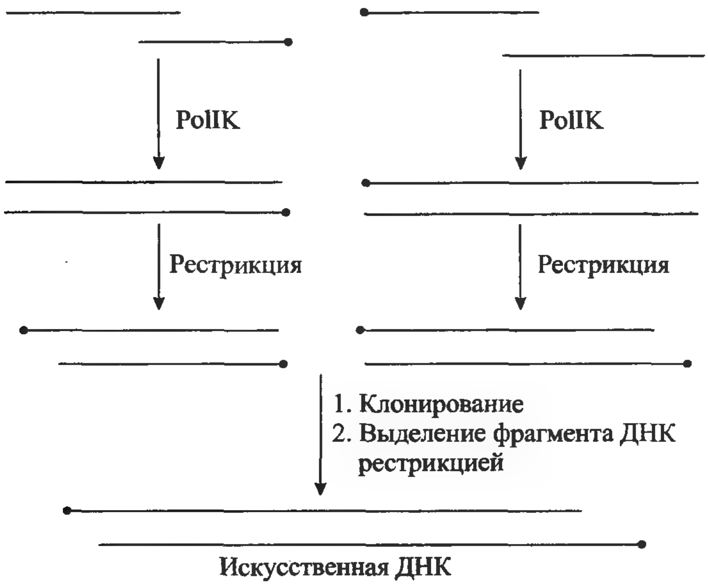


Рис. 1.53. Схема конструирования искусственных ДНК по Итакуре

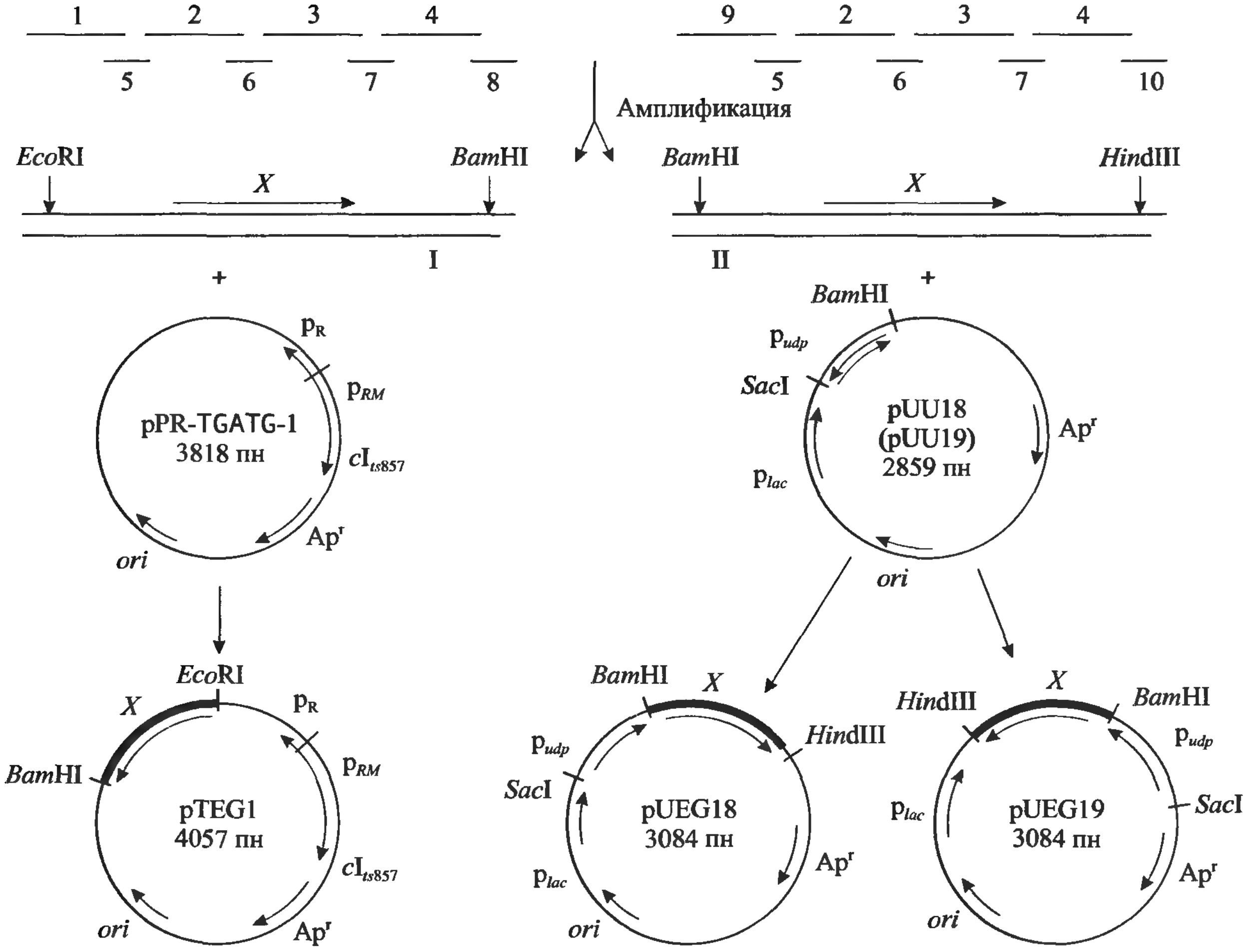


Рис. 1.54. Схема конструирования гена эглина С.
X — последовательность целевого гена

*Pst*I *Fok*I *Hga*I *Sal*I *Hind*III *Bam*HI *Hga*I *Fok*I *Eco*RI

```
    GG ATG ACG CGT CGA CAA GCT TGG ATC CGC GTC ATC CAG
ACG TCC TAC TGC GCA GCT GTT CGA ACC TAG GCG CAG TAG GTC TTAA
```

*Acc*I

Рис. 1.55. Нуклеотидная последовательность полилинкерной области плазмиды pFH123

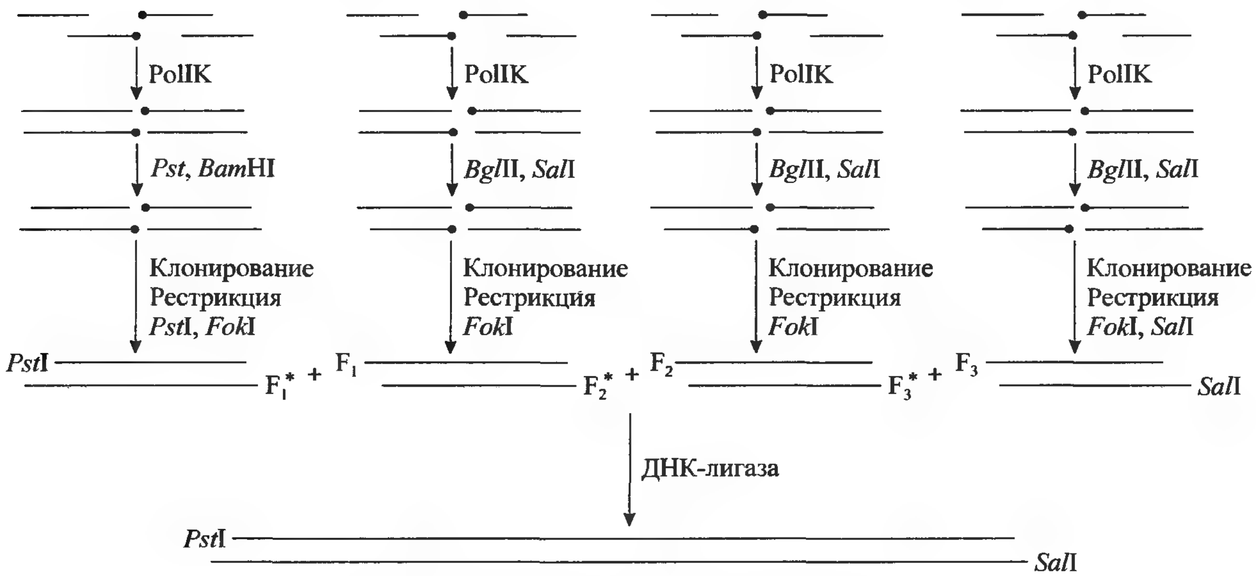


Рис. 1.56. Схема конструирования гена IL-2.

F_i, F_i^* — взаимокомплементарные одноцепочечные последовательности нуклеотидов, образующиеся под действием рестриктазы *Fok*I

рестрикции *Fok*I принадлежит к рестриктазам подкласса IIS и расщепляет полинуклеотидную цепь на расстоянии 9 нуклеотидов от 3′-конца сайта узнавания (GGATG) и 13 нуклеотидов от 5′-конца комплементарной последовательности CCTAC. Подобным же образом (на расстоянии 5 и 10 нуклеотидов от сайта узнавания соответственно) расщепляет ДНК эндонуклеаза рестрикции *Hga*I.

Использование векторов pMB и pFH значительно упрощает сборку протяженных фрагментов ДНК по методу Итакуры, поскольку клонированные в этих векторах субфрагменты можно выделить с любыми заранее запланированными липкими концами действием рестриктаз *Fok*I или *Hga*I. При разбиении целевой последовательности на субфрагменты структура липких концов выбирается таким образом, чтобы они не были самокомплементарными и обеспечивали однозначную сборку целевого гена. Полученные субфрагменты одностадийно собираются в целевую структуру и клонируются в подходящем векторе.

Схема конструирования гена человеческого интерлейкина 2 с применением векторов серии pFH приведена на рис. 1.56.

1.12.3. Конструирование искусственных генов из сверхдлинных полинуклеотидов

Логическим продолжением метода Итакуры можно считать метод, предложенный В. Мандеки с соавторами, в котором достройка полного дуплекса осуществляется *in vivo*, а не *in vitro*.

Последовательность искусственного гена разбивается на полинуклеотиды длиной 80–90 нуклеотидных звеньев. Они дополняются с 5′- и 3′-концов 18-членными последовательностями, комплементарными участкам векторной плазмиды, окружающим уникальный сайт рестрикции (например *Bsm*I). Векторная плазмида линеаризуется по этому сайту и отжигается с полинуклеотидом. Полученной смесью трансформируют компетентные клетки *E. coli*. Комплементарная синтетическому полинуклеотиду цепь синтезируется *in vivo* «хозяйской» ДНК-полимеразой *E. coli*.

Поскольку сайт *Bsm*I расположен в области гена *lacZ*, синтетические полинуклеотиды выбирают таким образом, чтобы облегчить фенотипический отбор рекомбинантов. Кроме того, в 3′-концевой последовательности каждого полинуклеотида содержится полный *Bsm*I-сайт,

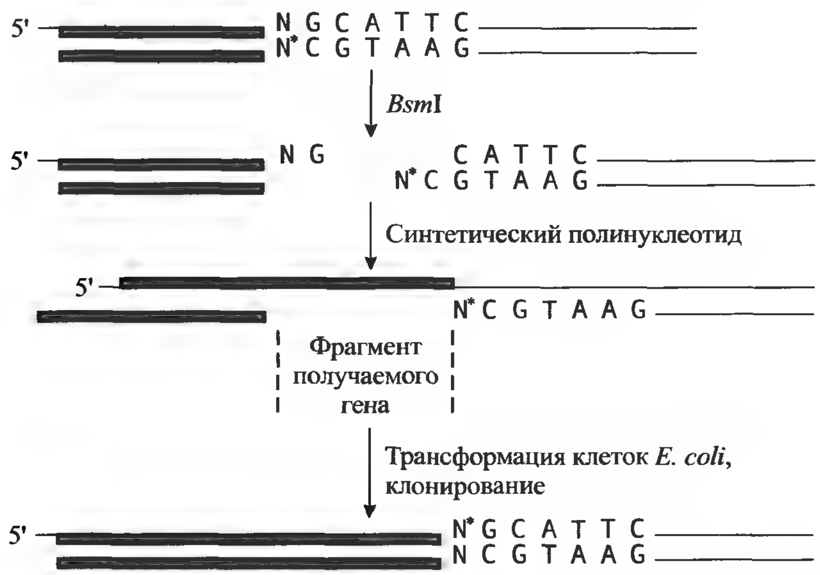


Рис. 1.57. Конструирование искусственных генов по Мандеки.
Жирная черта — последовательность синтезируемого гена, тонкая — вектора

для того чтобы он регенерировался в векторе на каждой стадии. После клонирования первого полинуклеотида (рис. 1.57) точно таким же образом клонируют второй и т. д. до получения целевой структуры. Этим методом был сконструирован ген анафилатоксина С3а человека.

Предложенный В. Мандеки способ привлекателен тем, что при синтезе целевого дуплекса можно ограничиться получением только одной цепи. Кроме того, нет необходимости проводить лигирование фрагментов ДНК. Достаточно легко осуществлять отбор рекомбинантных клонов. *Bsm*I выбрана в качестве эндонуклеазы рестрикции для линеаризации благодаря ее уникальным свойствам. Она узнает 6-членную непалиндромную последовательность и отрезает свой сайт узнавания от произвольной последовательности. В этом же качестве могут использоваться любые эндонуклеазы подкласса IIS (*Alw*, *Bsp*MI, *Fok*I, *Hga*I, *Hph*I), если в векторе имеется только один их участок узнавания.

1.12.4. Использование для синтеза генов полимеразной цепной реакции

П. Диллон и К. Розен, основываясь на том, что перекрывающиеся олигонуклеотиды могут быть использованы для синтеза ДНК с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I, предложили применить двустадийную ПЦР и синтетические полинуклеотиды в качестве матрицы для синтеза искусственных генов. Ген *Rev* HIV-2, содержащий триплеты, предпочтительно использующиеся в *E. coli*, получали из четырех частично перекрывающихся полинуклеотидов длиной 105 звеньев (рис. 1.58). Синтезированные полинуклеотиды образовывали 20–25-звенные двухцепочечные участки, которые служили в качестве праймеров для *Taq*-полимеразы в ПЦР. В целом полинуклеотиды кодировали ген длиной 300 пн и два сайта, расположенных в полинуклеотидах A и D и необходимых для последующего клонирования.

На первой стадии проводили ПЦР полинуклеотидов A, B, C, D в присутствии *Taq*-полимеразы. Полученный продукт реакции, не являющийся по данным гель-электрофореза гомогенным, вводили в ПЦР с короткими (длиной 30 нуклеотидных звеньев) олигонуклеотидами E и F. В результате второй реакции образовался индивидуальный дуплекс, который затем был клонирован, но данные о правильности его нуклеотидной структуры отсутствуют.

Аналогичный подход был использован для получения гена, кодирующего бактериородопсин (bR). Целевой ген, спроектированный для кассетного мутагенеза, был разделен на 3 фрагмента и содержал в своем составе 33 уникальных сайта. Каждый из фрагментов разбивали на полинуклеотиды длиной от 70 до 100 звеньев

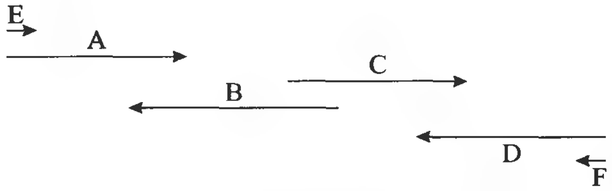


Рис. 1.58. Схема синтеза гена *Rev* HIV-2 с помощью ПЦР на синтетических полинуклеотидах

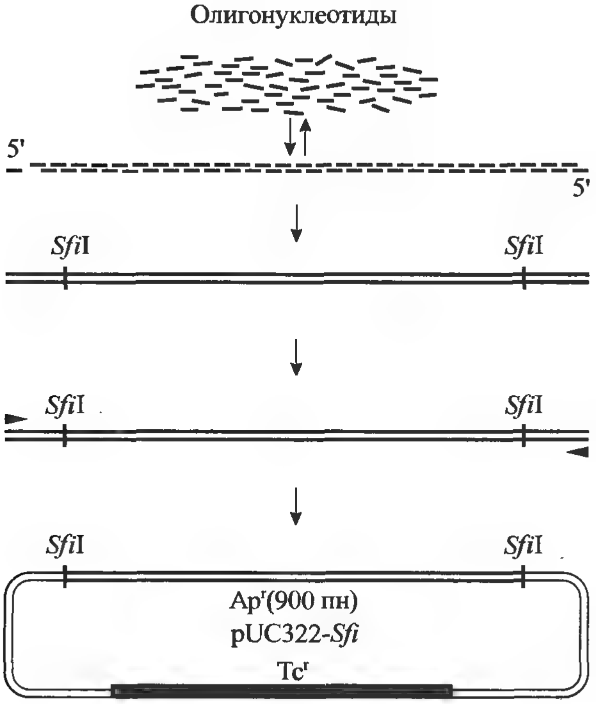


Рис. 1.59. Схема использования ПЦР для одностадийной сборки генов.

Треугольниками обозначены праймеры для амплификации

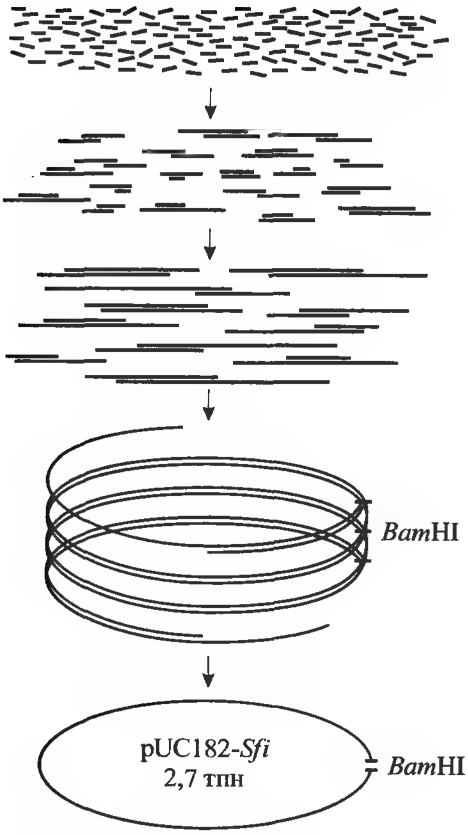


Рис. 1.60. Схема синтеза плазмиды pUC182-*Sfi*

так, чтобы они могли попарно образовывать дуплексы уникального состава длиной 20 пар нуклеотидов, а возможность внутримолекулярного спаривания в каждом полинуклеотиде была минимальной.

Авторы исследовали влияние концентрации полинуклеотидов и трифосфатов, природы термостабильной полимеразы и условий проведения реакции на синтез как целевого гена, так и отдельных его фрагментов. В ПЦР использовали ДНК-полимеразы *Taq*, Vent$_R$(exo$^-$) и Vent$_R$. Клоны, содержащие полноразмерный целевой ген и полученные с помощью различных полимераз, были секвенированы. Для ДНК-полимеразы Vent$_R$(exo$^-$) наблюдалось 0,24 % ошибок (0,15 % замен, 0,07 % делеций и 0,02 % вставок) на один нуклеотид целевой последовательности, для *Taq*-полимеразы — 0,19 %. Для ДНК-полимеразы Vent$_R$, которая способна исправлять ошибки при синтезе олигонуклеотидной цепи, наблюдали аналогичный результат — 0,22 % ошибок.

Из этих данных следует, что 3′–5′-корректирующие свойства ДНК-полимеразы Vent$_R$ практически не влияют на соотношение клонов с правильной и неправильной структурой. По-видимому, ошибки в синтезированных генах не связаны с точностью копирования ДНК-полимеразами. Судя по всему, эти ошибки уже существовали в синтетических олигонуклеотидах. Полученные результаты хорошо согласуются с данными о том, что величина ошибки при синтезе полинуклеотидов составляет в среднем 0,15 % на нуклеотид.

С помощью ПЦР целевой ген может быть собран из большого числа олигонуклеотидов, с использованием метода рекомбинации *in vitro*. На рис. 1.59 приведена схема синтеза фрагмента размером 1,1 тпн, содержащего промоторную область и ген β-лактамазы (*bla*).

Всего было синтезировано 56 олигонуклеотидов длиной 40 звеньев, кодирующих обе цепи целевого дуплекса. Разбиение на олигонуклеотиды осуществлено таким образом, чтобы каждый из них перекрывался с соседними фрагментом длиной в 20 нуклеотидов. Ген *bla* был фланкирован для удобства клонирования сайтами рестриктазы *Sfi*I. В целом ген синтезирован в 4 стадии: синтез олигонуклеотидов, сборка гена, амплификация гена, клонирование искусственного гена в pUC322. 76 % полученных при клонировании колоний имели ожидаемый фенотип Tc^r. Однако единственный секвенированный клон имел в составе целевого гена три мутации.

Этот же подход применяли для синтеза плазмиды pUC182-*Sfi*, которая отличается от pUC182 только наличием фланкирующих ген *bla* двух *Sfi*I-сайтов. Дуплекс, соответствующий плазмиде, получали из 134 полинуклеотидов длиной 40 звеньев, а также из двух 47- и 56-нуклеотидных фрагментов. Все полинуклеотиды одновременно использовали в трехстадийной ПЦР, в результате был получен высокомолекулярный мультимер (рис. 1.60).

Гидролиз полученного мультимера с помощью *Eco*RI, *Bam*HI, *Pst*I, *Bgl*I, *Sfi*I или *Nco*I давал ожидаемую для pUC182-*Sfi* рестрикционную картину. Препарат ДНК, полученный после гидролиза *Bam*HI и очищенный с помощью гель-электрофореза, циклизовали с помощью ДНК-лигазы Т4 и использовали для трансформации клеток *E. coli* XL1-blue. В результате образовалось большое количество синих колоний. Данных секвенирования полученной плазмиды нет, что сильно снижает ценность разработанного метода. По-видимому, рассматриваемый метод может быть успешно использован для получения мутантных генов с помощью кассетного мутагенеза (см. 7.1). Применимость же его для синтеза генов с точно заданной структурой вызывает сомнения.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Арбер В. Изменчивость, контролируемая хозяином // Фаг лямбда. М.: Мир, 1975. С. 112–128.

Белявский А. В., Раевский К. Амплификация тотальной кДНК *in vitro* // Докл. АН СССР. 1988. Т. 303. С. 1498–1501.

Гаврилова Е. В., Бабкин И. В., Щелкунов С. Н. Мультиплексный ПЦР-анализ для видоспецифичной экспресс-идентификации ортопоксвирусов // Молекул. генетика, микробиол. и вирусол. 2003. № 1. С. 45–52.

Георгиев Г. П. Гены высших организмов и их экспрессия. М.: Наука, 1989. 254 с.

Кавсан В. М. Определение полной нуклеотидной последовательности генома человека: проекты и перспективы // Биополимеры и клетка. 1989. Т. 5. С. 16–25.

Клонирование ДНК. Методы / Под ред. Д. Гловера. М.: Мир, 1988. 538 с.

Корнберг А. Синтез ДНК. М.: Мир, 1977. 359 с.

Краев А. С., Скрябин К. Г. Методы изучения первичных структур нуклеиновых кислот // Итоги науки и техники. Сер. Молекуляр. биология / ВИНИТИ. М., 1980. Т. 12: Генетическая инженерия (методы). Ч. II. С. 141–197.

Лысов Ю. П., Флорентьев В. Л., Хорлин А. А. и др. Определение нуклеотидной последовательности ДНК гибридизацией с олигонуклеотидами. Новый метод // Докл. АН СССР. 1988. Т. 303. С. 1508–1511.

Михеев М. В., Лапа С. А., Щелкунов С. Н. и др. Видовая идентификация ортопоксвирусов на олигонуклеотидных микрочипах // Вопр. вирусол. 2003. Т. 48, № 1. С. 4–9.

Овчинников Ю. А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987. 815 с.

Пташне М. Переключение генов. Регуляция генной активности и фаг λ. М.: Мир, 1988. 158 с.

Репин В. Е., Щелкунов С. Н. Распространение и функция рестриктаз // Успехи соврем. биологии. 1990. Т. 110. С. 34–47.

Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д. Рекомбинантные ДНК: Краткий курс. М.: Мир, 1986. 285 с.

Черемис А. В., Ахунов Э. Д., Вахитов В. А. Секвенирование ДНК. М.: Наука, 1999. 429 с.

Щелкунов С. Н. Конструирование гибридных молекул ДНК. Новосибирск: Наука, 1987. 168 с.

Янковский Н. К. Конструирование и анализ клонотек геномов. М.: ВИНИТИ, 1989. 252 с. (Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. Т. 16).

Andersson L., Bohme J., Rask L., Peterson P. A. Genomic hybridization of bovine class II major histocompatibility genes: 1. Extensive polymorphism of DQα and DQβ genes // Animal Genet. 1986. Vol. 17. P. 95–112.

Arnold W., Puhler A. A family of high-copy-number plasmid vectors with single end-label sites for rapid nucleotide sequencing // Gene. 1988. Vol. 70. P. 171–179.

Bej A. K., Mahbubani M. H., Atlas R. M. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 1991. Vol. 26. P. 301–334.

Bicle T. A. The ATP-dependent restriction endonucleases // Proc. of Nuclease meet., Cold Spring Harbor, Aug. 1981. Cold Spring Harbor, 1982. P. 85–108.

Bigger C. B., Brasky K. M., Lanford R. E. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection // J. Virol. 2001. Vol. 75. P. 7059–7066.

Campa A. G. de la, Kale P., Springhorn S. S., Lacks S. A. Proteins encoded by the DpnII restriction gene cassete. Two methylases and an endonuclease // J. Mol. Biol. 1987. Vol. 196. P. 457–469.

Cha R. S., Thilly W. G. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR // PCR Methods Appl. 1993. Vol. 3. P. S18–S29.

Chambers J., Angulo A., Amaratunga D. et al. DNA microarrays of the complex human cytomegalovirus genome: Profiling kinetic class with drug sensitivity of viral gene expression // J. Virol. 1999. Vol. 73. P. 5757–5766.

Chan P. T., Ohmori H., Tomizawa J. I., Lebowitz J. Nucleotide sequence and gene organization of

ColE1 DNA // J. Biol. Chem. 1985. Vol. 260. P. 8925–8935.

Dower W. J., Miller J. F., Ragsdale C. W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation // Nucl. Acids Res. 1988. Vol. 16. P. 6127–6145.

Elnifro E. M., Ashshi A. M., Cooper R. J., Klapper P. E. Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology // Clinic. Microbiol. Rev. 2000. Vol. 13. P. 559–570.

Engelke D. R., Hoener P. A., Collins F. S. Direct sequencing of enzymatically amplified human genomic DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. Vol. 85. P. 544–548.

Ferris S., Freeby S., Zoller P. et al. A megabase DNA electrophoresis system // Amer. Biotechnol. Lab. 1989. Vol. 7. P. 36–42.

Freemont P. S., Ollis D. L., Steitz T. A., Joyce C. M. A domain of the Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I has polymerase but no exonuclease activity // Proteins: Structure, Function, and Genetics. 1986. Vol. 1. P. 66–73.

Guerra S., Lopez-Fernandez L. A., Pascual-Montano A. et al. Cellular gene expression survey of vaccinia virus infection of human HeLa cells // J. Virol. 2003. Vol. 77. P. 6493-6506.

Humbelin M., Suri B., Rao D. N. et al. Type III DNA restriction and modification systems *Eco*P1 and *Eco*P15 // J. Mol. Biol. 1988. Vol. 200. P. 23 29.

Ishida S., Huang E., Zuzan H. et al. Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis // Mol. Cell. Biol. 2001. Vol. 21. P. 4684–4699.

Karreman C., Waard A. de. Cloning and complete nucleotide sequences of the type II restriction-modification genes of *Salmonella infantis* // J. Bacteriol. 1988. Vol. 170. P. 2527–2532.

Keohavong P., Kat A. G., Cariello N. F., Thilly W. G. DNA amplification *in vitro* using T4 DNA polymerase // DNA. 1988. Vol. 7. P. 63–70.

Keohavong P., Wang C. C., Cha R. S., Thilly W. G. Enzymatic amplification and characterization of large DNA fragments from genomic DNA // Gene. 1988. Vol. 71. P. 211 -216.

Kessler C., Holtke H. J. Specificity of restriction endonucleases and metylases: Review // Gene. 1986. Vol. 47. P. 1–153.

Khorana H. G., Agarval K. L., Besmer P. et al. Total synthesis of the structural gene for the precursor of a tyrosine suppressor transfer RNA from *E. coli* // J. Biol. Chem. 1976. Vol. 251. P. 565–670.

Kim S. C., Podhajska A. J., Szybalski W. Cleaving DNA at any predetermined site with adapter-primers and class-IIS restriction enzymes // Science. 1988. Vol. 240. P. 504–506.

Kim H. S., Smithies O. Recombinant fragment assay for gene targetting based on the polymerase chain reaction // Nucl. Acids Res. 1988. Vol. 16. P. 8887–8903.

Kolata G. B. DNA sequencing: a new era in molecular biology // Science. 1976. Vol. 192. P. 645–647.

Lai-Golgman M., Lai E., Grody W. W. Detection of human immunodeficiency virus (HIV) infection in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by DNA amplification // Nucl. Acids Res. 1988. Vol. 16. P. 8191.

Lander E. S., Linton L. M., Birren B. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome // Nature. 2001. Vol. 409. P. 860–921.

Lawrance S. K., Srivastava R., Rigas B. et al. Molecular approaches to the characterization of megabase regions of DNA: applications to the human major histocompatibility complex // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1986. Vol. 51. P. 123–130.

Lee J. J., Smith H. O. Sizing of the *Haemophilus influenzae* Rd genome by pulsed-field agarose gel electrophoresis // J. Bacteriol. 1988. Vol. 170. P. 4402–4405.

Li H., Gyllensten U. B., Cui X. et al. Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells // Nature. 1988. Vol. 335. P. 414–417.

Mandecki W. A method for site-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. Vol. 83. P. 7177–7182.

Mirzabekov A. D. Properties, manufacturing, and applications of microarrays of gel-immobilized compounds and cells on a chip // Microfabricated Sensors. Application of Optical Technology for DNA Analysis / Ed. by R. Kordai et al. American Chemical Society. 2002. P. 23–41.

Morgan R. D. *Mse*I, a unique restriction endonuclease from *Micrococcus* species which recognizes 5′TTAA3′ // Nucl. Acids Res. 1988. Vol. 16. P. 3104.

Mullis K., Faloona F., Scharf S. et al. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polimerase chain reaction // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1986. Vol. 51. P. 263–273.

Paabo S., Wilson A. C. Polymerase chain reaction reveals cloning artifacts // Nature. 1988. Vol. 334. P. 387–388.

Paabo S., Gifford J. A., Wilson A. C. Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain // Nucl. Acids Res. 1988. Vol. 16. P. 9775–9787.

Peltonen L., McKusick V. A. Dissecting human disease in the postgenomic era // Science. 2001. Vol. 291. P. 1224-1229.

Potter H. Electroporation in biology: methods, applications, and instrumentation // Analyt. Biochem. 1988. Vol. 174. P. 361–373.

Robertson J. M., Walsh-Weller J. An introduction to PCR primer design and optimisation of amplification reactions // Methods Mol. Biol. 1998. Vol. 98. P. 121 154.

Rossi J. J., Kierzek R., Hung T. et al. An alternate method of synthesis of double-stranded DNA segments // J. Biol. Chem. 1982. Vol. 103. P. 706–708.

Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with

a thermostable DNA polymerase // Science. 1988. Vol. 239. P. 487–491.

Sanger F., Air G. M., Barrell B. G. et al. Nucleotide sequence of bacteriophage *ϕ*X174 DNA // Nature. 1977. Vol. 265. P. 687–695.

Schena M., Shalon D., Davis R. W., Brown P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray // Science. 1995. Vol. 270. P. 467–470.

Schoner B., Kelly S., Smith H. O. The nucleotide sequence of the *Hha*II restriction and modification genes from *Haemophilus haemolyticus* // Gene. 1983. Vol. 24. P. 227–236.

Shibata D., Martin W. J., Arnheim N. Analysis of DNA sequences in forty-year-old paraffin-embedded thin-tissue sections: a bridge between molecular biology and classical histology // Cancer Res. 1988. Vol. 48. P. 564–4566.

Silver J., Keerikatte V. Novel use of polymerase chain reaction to amplify cellular DNA adjacent to an integrated provirus // J. Virol. 1989. Vol. 63. P. 1924–1928.

Studier F. W., Bandyopadhyay P. K. Model for how type I restriction enzymes select cleavage sites in DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. Vol. 85. P. 4677–4681.

Van't Wout A. B., Lehrman G. K., Mikheeva S. A. et al. Cellular gene expression upon human immunodeficiency virus type 1 infection of $CD4^+$-T-cell lines // J. Virol. 2003. Vol. 77. P. 1392–1402.

Venter J. C., Adams M. D., Myers E. W. et al. The sequence of the human genome // Science. 2001. Vol. 291. P. 1304–1351.

Wei J., Goldberg M. B., Burland V. et al. Complete genome sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* serotype 2a strain 2457T // Infect. Immun. 2003. Vol. 71. P. 2775–2786.

Wilson G. G. Type II restriction–modification systems // Trends in Genetics. 1988. Vol. 4. P. 314–318.

Xia Y., Narva K. E., Van Etten L. The cleavage site of the *Rsa*I isoschizomer, *Cvi*II, is G↓TAC // Nucl. Acids Res. 1987. Vol. 15. P. 1063.

Xia Y., Burbank D. E., Uher L. et al. IL-3A virus infection of *Chlorella*-like green alga induces a DNA restriction endonuclease with novel sequence specificity // Nucl. Acids Res. 1987. Vol. 15. P. 6075–6090.

Zhu H., Cong J.-P., Mamtora G. et al. Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: Global monitoring with oligonucleotide arrays // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1998. Vol. 95. P. 14470–14475.

Глава 2
ВЕКТОРНАЯ СИСТЕМА ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *ESCHERICHIA COLI*

Бактерия *Escherichia coli* (кишечная палочка) — самая изученная клетка из всех существующих. Именно в клетках *E. coli* впервые был обнаружен половой фактор и доказано, что он является внехромосомной кольцевой двухцепочечной молекулой ДНК. Интенсивному исследованию подверглись и другие плазмиды этой бактерии. Большинство наиболее полно изученных бактериальных вирусов (фагов) также имеют в качестве клетки-хозяина *E. coli*.

К моменту появления методологии конструирования гибридных молекул ДНК *in vitro* были разработаны методы выделения фаговых и плазмидных ДНК в нативном виде и их очистки, способы введения этих молекул в клетки *E. coli* и отбора клонов трансформантов и трансфектантов. Наличие данной методической базы и обусловило то, что именно *E. coli*, ее плазмиды и фаги явились первыми объектами генетической инженерии, на которых удалось достичь сенсационных результатов по клонированию и экспрессии чужеродных генов.

2.1. ВВЕДЕНИЕ ПЛАЗМИДНЫХ И ФАГОВЫХ МОЛЕКУЛ ДНК В КЛЕТКИ *E. COLI*

2.1.1. Строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий

В 1884 г. К. Грам разработал метод дифференциальной окраски клеток бактерий, который до настоящего времени используется при таксономическом определении бактерий. Суть данной процедуры состоит в следующем. Клетки в мазке на предметном стекле, фиксированном нагреванием, сначала окрашивают основным красителем — кристаллическим фиолетовым, а затем обрабатывают раствором йода. Йод образует с кристаллическим фиолетовым комплекс, нерастворимый в воде и плохо растворимый в спирте или ацетоне. После этого мазки обрабатывают спиртом (или ацетоном). Грамотрицательные клетки обесцвечиваются, а грамположительные сохраняют интенсивную синечерную окраску. Хотя этот метод окраски используется очень давно, лишь в 1960-е гг. удалось показать, что явление дифференциальной окраски обусловлено фундаментальными различиями в структуре клеточных стенок двух типов бактерий.

Строение клеточной стенки грамположительных бактерий рассмотрено в разделе 10.1.1. В данной главе ознакомимся со строением клеточной стенки грамотрицательной бактерии *E. coli*.

Содержимое клетки ограничено бислойной фосфолипидной плазматической мембраной (рис. 2.1), в состав которой входят и так называемые интегральные белки мембран. Они располагаются в липидном бислое, будучи погружены в него частично или же пронизывая его насквозь. Другие белки прикреплены к поверхности мембраны, и их называют периферическими белками. Цитоплазма клетки, окруженная плазматической мембраной, представляет собой протопласт.

Протопласт *E. coli* «одет» в пептидогликановый мешок, прилегающий к внешней мембране (см. рис. 2.1). Пептидогликаны — гетерополимеры характерного состава и структуры, синтезируемые исключительно прокариотами. Их мономерными компонентами являются два ацетилированных аминосахара — N-ацетилглюкозамин и N-ацетилмурамовая кислота, а также небольшое число аминокислот, причем некоторые из них являются «неприродными» в том смысле, что они никогда не встречаются в белках. Чередующиеся остатки N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединенные β-1,4-гликозидными связями, образу-

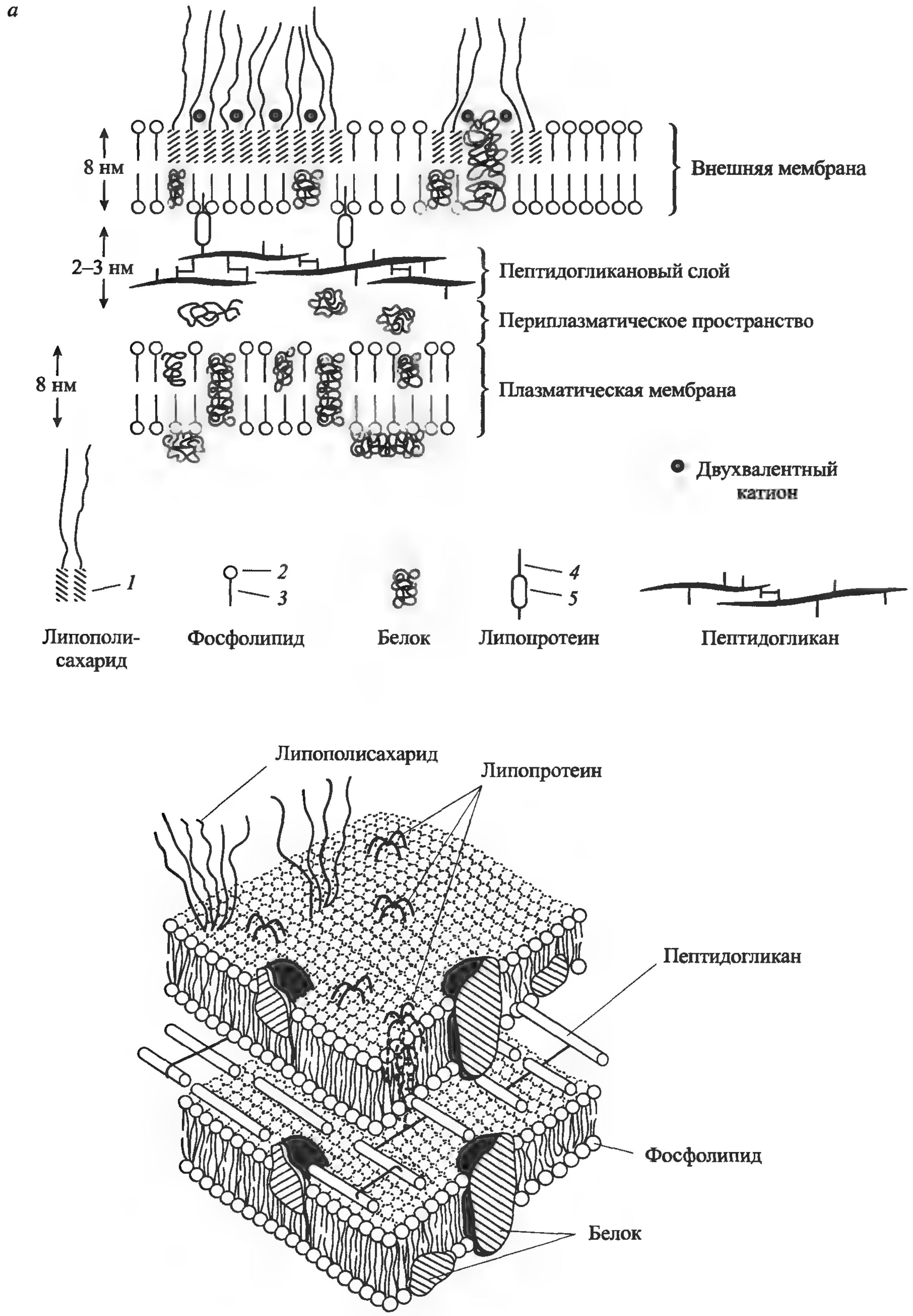


Рис. *2.1.* Схема строения клеточной стенки *E. coli*:

а — в поперечном, *б* — в трехмерном срезе; *1* — липид А; *2* — полярная голова; *3* — гидрофобная цепь жирной кислоты; *4* — липидная часть молекулы, *5* — ее белковая часть

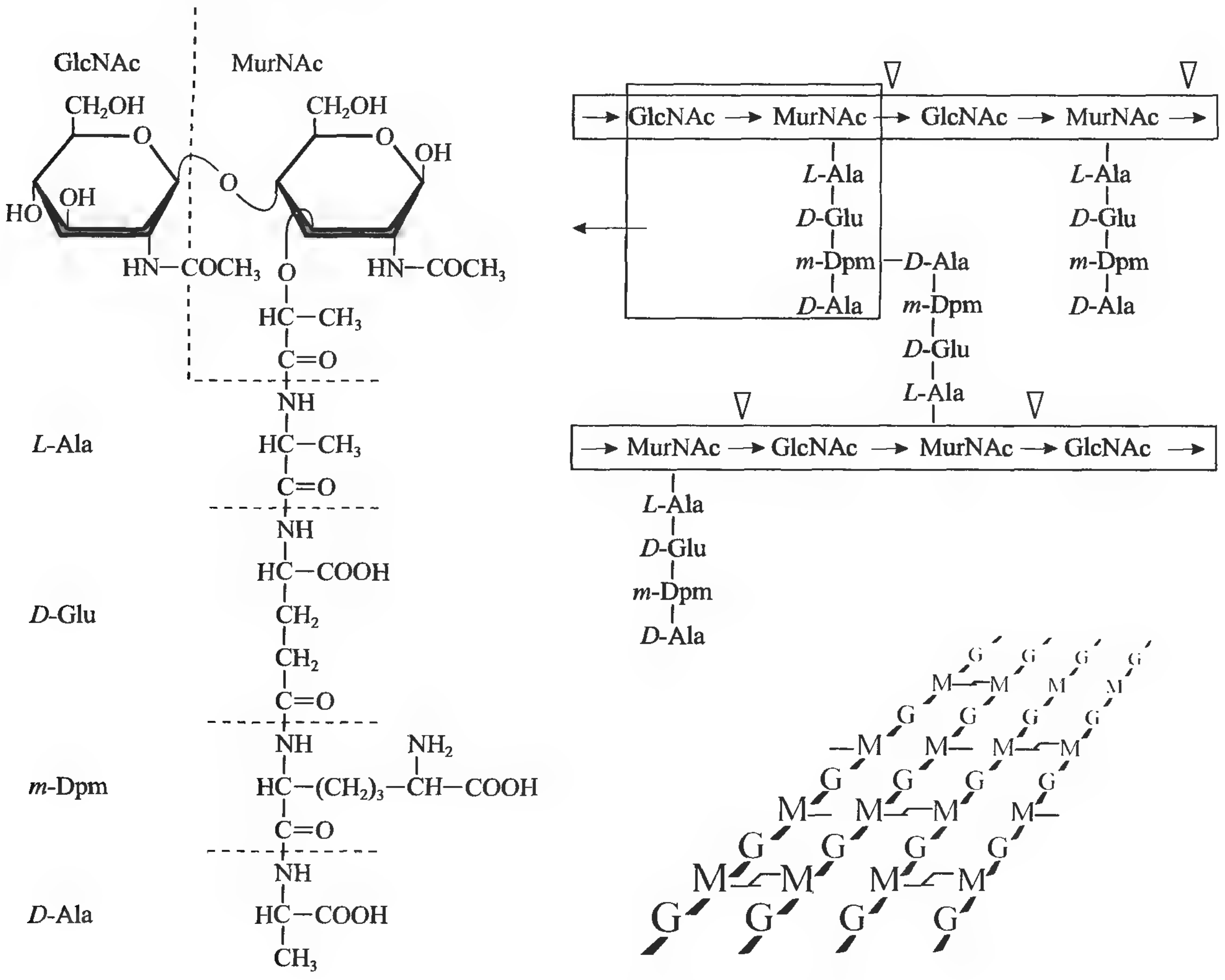


Рис. 2.2. Структура пептидогликана *E. coli.*

Гетерополимерные цепочки, состоящие из чередующихся остатков N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) и N-ацетилмурамовой кислоты (MurNAc), связаны между собой пептидными мостиками. *Справа внизу* — схематическое перспективное изображение структуры однослойного поперечносшитого пептидогликанового мешка, состоящего из GlcNAc (G) и MurNAc (M). Треугольниками отмечены связи, расщепляемые лизоцимом; m-Dpm — мезодиаминопимелиновая кислота

ют цепи гликанов (рис. 2.2). Каждая цепь содержит от 10 до 65 дисахаридных единиц. Остатки мурамовой кислоты через лактильные группы соединены пептидной связью с цепочкой из четырех аминокислот. Пептидные цепочки соседних нитей гликанов соединяются между собой поперечными сшивками, возникающими вследствие образования пептидной связи между *D*-аланином в положении 4 одной пептидной цепочки и свободной аминогруппой мезодиаминопимелиновой кислоты в положении 3 другой цепочки (см. рис. 2.2).

В результате образования таких пептидных мостиков пептидогликан представляет собой молекулярную сеть — мешковидную макромолекулу огромного размера, которая полностью окружает и изолирует протопласт, уравновешивая его внутреннее давление, обусловленное осмотическими факторами. В клетках *E. coli* пептидогликановый мешок однослойный. Поверх него располагается наружная (внешняя) мембрана. Этот слой клеточной стенки состоит из белков, фосфолипидов и липополисахаридов (см. рис. 2.1). Наружная мембрана плотно прилегает к пептидогликановому слою и связана с ним липопротеинами особого типа. Молекулы этих липопротеинов ковалентно соединены пептидной связью с некоторыми остатками мезодиаминопимелиновой кислоты, входящей в пептидогликановую сеть. Они выступают из этого слоя наружу, причем наиболее удаленной от его поверхности оказывается липидная часть молекулы липопротеина, которая благодаря гидрофобному взаимодействию закрепляется в липофильном двойном слое наружной мембраны.

Наряду с фосфолипидами и белками большую роль в формировании наружной мембраны *E. coli*, как и других грамотрицательных бак-

терий, играют липополисахариды, которые располагаются на внешней стороне наружной мембраны. Гидрофобные концы липополисахаридов находятся в двойном липофильном слое мембраны, а гидрофильные полисахаридные концы обращены наружу. Для сохранения стабильности липополисахаридного слоя необходимы двухвалентные катионы.

Между пептидогликановым слоем и плазматической мембраной у грамотрицательных клеток существует промежуток, называемый периплазматическим пространством. В нем находятся белки, осуществляющие разные функции. Периплазматическое пространство, по-видимому, важно для осморегуляции клетки.

2.1.2. Сферопласты

Escherichia coli относится к тем микроорганизмам, которые не обладают физиологической компетентностью к поглощению экзогенных молекул ДНК. Поэтому для введения ДНК внутрь данной грамотрицательной бактерии необходимо создать условия, позволяющие преодолеть барьер клеточной стенки. Первые успехи на этом пути были достигнуты в 1960-е гг. при анализе инфекционности фаговых ДНК в системе сферопластов *E. coli*. Сферопласты обычно получают путем обработки бактериальных клеток в изотоническом растворе лизоцимом, являющимся бактерицидным ферментом, который содержится в слезной жидкости, носовой слизи, яичном белке, клетках бактерий и т. д. Лизоцим, эффективно гидролизующий пептидогликан грамположительных клеток, в тех же условиях не деградирует пептидогликановый слой грамотрицательных бактерий, поскольку не может проникнуть через внешнюю мембрану клетки.

Липополисахаридный слой внешней мембраны грамотрицательных бактерий стабилизирован двухвалентными катионами, и поэтому для «разрыхления» внешней мембраны используют комплексообразующий агент ЭДТА (этилендиаминтетраацетат), связывающий двухвалентные катионы. В результате обработки ЭДТА часть липополисахаридов высвобождается из внешней мембраны клетки, и лизоцим после этого способен достигать пептидогликанового слоя и гидролизовать его. Лизоцим расщепляет в пептидогликане гликозидную связь между углеродом C^1 N-ацетилглюкозамина и C^4 N-ацетилмурамовой кислоты. При этом полисахаридные цепи распадаются на дисахаридные фрагменты (см. рис. 2.2).

Многочисленные усовершенствования методов получения сферопластов *E. coli* позволили достичь достаточно высокой эффективности трансфекции молекулами ДНК различных фагов. Обнаружено, что на инфекционность существенное влияние оказывает форма молекул фаговых ДНК, которую они принимают *in vivo*. Фаги с кольцевой ДНК или линейной ДНК, быстро замыкающейся *in vivo* в кольцо (лямбдоидные фаги), характеризуются наибольшей эффективностью трансфекции. Доказано, что молекулы ДНК проникают в сферопласты в нативной двухцепочечной форме.

2.1.3. «Кальциевые» компетентные клетки

Хотя ЭДТА-лизоцимные сферопласты *E. coli* в некоторых экспериментах могут обеспечивать высокую эффективность трансфекции фаговыми ДНК (до 10^{-3} БОЕ на молекулу ДНК фага λ), процесс их получения многостадиен и дает плохо воспроизводимые результаты. Поэтому данный методический подход не нашел широкого применения. Начиная с 1970 г. его почти полностью вытеснил метод $CaCl_2$-зависимой трансфекции клеток *E. coli*, который разработали М. Мандель и А. Хига. Они обнаружили, что обработка культуры *E. coli* раствором $CaCl_2$ на холоде (0 °С) с последующим тепловым шоком (37 °С) приводит к поглощению клетками добавленных в среду молекул ДНК фага λ и завершается образованием инфекционного фагового потомства. Метод оказался крайне простым и воспроизводимым. Наиболее эффективно компетентность индуцируется в активно делящихся клетках *E. coli*. Разработан ряд модификаций данного метода, повышающих эффективность трансфекции клеток фаговыми ДНК.

Метод трансфекции, зависимой от катионов кальция, имеет несколько меньшую эффективность (до 10^{-4} БОЕ на молекулу ДНК фага λ), чем метод с использованием сферопластов, однако он гораздо проще и дает хорошо воспроизводимые результаты. Необходимо отметить, что $CaCl_2$-зависимая трансфекция успешно осуществляется лишь на ограниченном числе изученных штаммов *E. coli*, а на ее эффективность существенно влияет генотип клетки. Например, у *E. coli* K12 делеция галактозного оперона приводит к удалению галактозы из липополисахаридной оболочки и значительно усиливает способность штаммов к трансфекции ДНК фага λ; мутация *end*A вызывает исчезновение периплазматической эндонуклеазы I, что сущест-

венно повышает сохранность нативной структуры проникающих в клетки молекул ДНК.

Небольшие модификации, введенные в 1972 г. С. Коэном с сотрудниками в описанную методику, позволили осуществить трансформацию клеток, обработанных хлоридом кальция, плазмидными ДНК. При этом компетентность индуцировалась лишь у 0,1–1 % клеток культуры *E. coli*. Дальнейшие исследования показали, что частоту плазмидной трансформации можно повысить разными способами: подвергая смесь обработанных $CaCl_2$ клеток и ДНК тепловому шоку (42 °С); вводя в эту смесь моновалентные катионы; обрабатывая клетки дополнительно органическими растворителями, сульфгидрильными реагентами; выращивая клетки в среде с повышенным содержанием Mg^{2+} и др. Кропотливая систематическая работа по подбору штаммов и модификации «кальциевой» методики позволяет в ряде случаев повышать частоту плазмидной трансформации с 10^{-5} до 10^{-3} трансформантов на молекулу плазмиды.

Механизм индукции компетентного состояния клеток *E. coli*, обусловленной ионами кальция, наиболее подробно был исследован на примере плазмидной трансформации. Выяснилось, что в этом процессе критическую роль играет состояние липидов внешней мембраны клеток. Ионы Ca^{2+} (в меньшей степени Ba^{2+} и Mg^{2+}) могут индуцировать фазовый переход липидов мембраны, благодаря чему она приобретает вместо обычной двухслойной необычную гексагональную конфигурацию. Причем данный фазовый переход происходит во время температурного шока обработанных хлоридом кальция клеток и сопровождается поглощением экзогенных двухцепочечных молекул ДНК. Температура фазового перехода строго зависит от липидного состава мембраны. На одном из штаммов *E. coli* было показано, что при тепловом шоке, вызванном переносом обработанных $CaCl_2$ клеток с температуры 0 °С на 42 °С, поглощение молекул ДНК продолжается в течение лишь 20 с. Если после этого смесь клеток и ДНК снова резко охладить до температуры 0 °С, то в процессе индуцируемого фазового перехода липидов молекулы ДНК снова могут проникать в клетки. При этом период проникновения ДНК более продолжителен. Фазовые переходы липидов приводят к нарушению структуры внешней мембраны, но практически не затрагивают плазматическую мембрану клеток *E. coli*. Необходимо отметить, что через плазматическую мембрану молекулы ДНК способны проникать без теплового шока и бивалентных катионов, как это происходит у сферопластов, у которых отсутствует барьер внешней мембраны для макромолекул.

2.1.4. Электропорация

Благодаря простоте и надежности метод Ca^{2+}-индуцируемой компетентности клеток *E. coli* заслужил всеобщее внимание и до недавнего времени использовался практически во всех генно-инженерных экспериментах на клетках *E. coli*. В настоящее время данный физико-химический подход вытесняется физическим методом введения экзогенных молекул ДНК в клетки *E. coli* — электропорацией (см. 1.5). Последний более прост в исполнении и дает очень высокий результат: до 80 % выживших клеток *E. coli* могут поглотить молекулы ДНК, при этом 1 трансформант может быть получен на 50 молекул плазмиды. Другими методами такой эффективности достичь не удается.

2.1.5. Упаковка ДНК фага лямбда в капсиды *in vitro*

Для фага λ, часто используемого в качестве молекулярного вектора клеток *E. coli*, разработан метод упаковки ДНК *in vitro* в капсиды. Для этого требуются концентрированные экстракты клеток, индуцированных из лизогенного состояния. Используются мутанты фага, имеющие дефекты по разным генам белков головки капсида. Каждый из таких мутантов не способен образовывать полноценные фаговые частицы и упаковывать свою ДНК. При смешении же фаговой ДНК и белковых экстрактов клеток, в которых развивались мутанты, происходит комплементация недостающих функций и собираются инфекционные частицы. Биологическую активность эндогенной фаговой ДНК в экстрактах обычно подавляют УФ-облучением.

Сформированными *in vitro* частицами можно заражать клетки *E. coli* и получать фаговое потомство. Эффективность упаковки ДНК фага λ *in vitro* обычно составляет 10^{-2}–10^{-3}.

Важной особенностью данного подхода является то, что в капсид преимущественно упаковываются молекулы фаговых ДНК, имеющие размер, близкий к размеру фагового генома. Это позволяет после реакции лигирования фрагментов осуществлять селекцию гибридных молекул ДНК *in vitro* по размеру. Кроме того, в капсиды не упаковываются многочисленные побочные продукты лигазной реакции. Поэтому образовавшиеся после упаковки фаговые частицы инъецируют в бактериальные клетки лишь

фаговые ДНК заданного размера. При клонировании фрагментов в векторных молекулах ДНК фага λ обычно используют именно этот метод введения гибридных ДНК в клетку. Данный прием также необходим при клонировании фрагментов ДНК в составе космид и фазмид.

Создание простых и воспроизводимых методов введения в клетки *E. coli* плазмидных и фаговых ДНК в нативной форме явилось необходимым условием успешного развития работ по клонированию чужеродной генетической информации в этих клетках.

2.2. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЕКТОРЫ *E. COLI*

2.2.1. Клонирующие плазмидные векторы

Плазмиды — это внехромосомные генетические элементы, выявляемые в бактериях различных семейств. Они представляют собой двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК размером от 2 тпн до более чем 300 тпн. Плазмиды могут нести гены, которые обусловливают фенотипическое отличие содержащих их клеток от бесплазмидных клеток. Культура, несущая плазмиду, обозначается следующим образом: за наименованием бактериального штамма указывается в квадратных скобках название плазмиды, например, *E. coli* HB101[ColE1].

Репликация плазмид в значительной степени зависит от клетки-хозяина. Некоторые плазмиды реплицируются таким образом, что в клетке они находятся в одной или нескольких копиях. Это так называемые плазмиды со ***строгим контролем репликации***. Другие же плазмиды могут иметь в клетках 10–200 копий. Такие плазмиды находятся под ***ослабленным контролем репликации***. Количество копий плазмид с ослабленным контролем репликации можно увеличить до нескольких тысяч на клетку, если блокировать синтез белка в клетке обработкой хлорамфениколом. В отсутствие белкового синтеза репликация плазмид с ослабленным контролем продолжается, в то время как репликация ДНК бактериальной хромосомы и плазмид со строгим контролем прекращается.

Чтобы быть удобным клонирующим вектором, плазмида должна обладать рядом свойств:

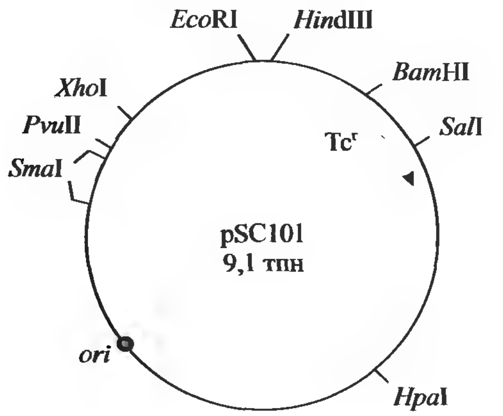
- нести селектируемый маркер (или несколько маркеров), что дает возможность легко идентифицировать клоны трансформантов и селективно поддерживать плазмиду в популяции бактериальных клеток;
- содержать предпочтительно единичные места расщепления одной или несколькими рестриктазами в районах плазмиды, несущественных для ее репликации;
- быть относительно небольшой и чаще всего иметь ослабленный контроль репликации, так как это упрощает процедуру выделения плазмидной ДНК и позволяет иметь в клетке высокую дозу клонированного гена;
- стабильно поддерживаться в клетках-реципиентах.

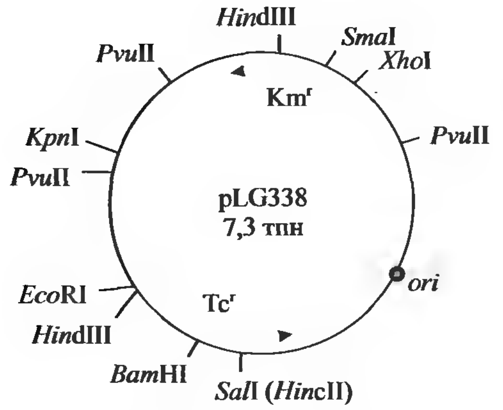
Рассмотрим некоторые векторные плазмиды клеток *E. coli*.

Плазмида pSC101 — первая векторная плазмида; она была выделена в 1973 г. в лаборатории С. Коэна. Плазмида имеет размер 9,1 тпн, находится под строгим контролем репликации, детерминирует устойчивость к тетрациклину (Tc^r) и обладает единственным местом действия рестриктазы *Eco*RI, которое расположено в несущественной для репликации области и не затрагивает ген устойчивости к тетрациклину (*tet*). Кроме того, на ДНК pSC101 в гене *tet* имеется по одному участку узнавания рестриктаз *Hin*dIII, *Bam*HI и *Sal*I (рис. 2.3).

Плазмида pSC101 как клонирующий вектор имеет ряд недостатков. Во-первых, при встройке фрагментов ДНК по *Eco*RI-месту обычно не удается фенотипически отличить клоны трансформантов бактериальных клеток, содержащих исходную или гибридные плазмиды (отбор гибридов приходится осуществлять гибридизацией нуклеиновых кислот *in situ*); во-вторых, при встройке по местам действия рестриктаз *Hin*dIII, *Bam*HI, *Sal*I нарушается ген *tet*, и клоны, содержащие гибридные плазмиды, будут иметь фенотип Tc^s, как и исходные клетки, и поэтому обычными методами их выявить нельзя; в-третьих, pSC101 имеет строгий контроль репликации и находится в клетке в количестве примерно шесть копий на бактериальную хромосому. Из-за перечисленных недостатков векторная плазмида pSC101 активно использовалась для клонирования фрагментов ДНК лишь в начальный период развития генетической инженерии, до появления векторов на основе других плазмид.

Генно-инженерные исследования, проводимые на *E. coli* в последующие годы, показали, что не все гены удается клонировать в многокопийных векторах. Это обусловлено тем, что повышенная доза клонированного гена приводит к суперсинтезу кодируемого им белка, а высокая концентрация ряда структурных белков клеточной стенки или белков, участвующих в регу-





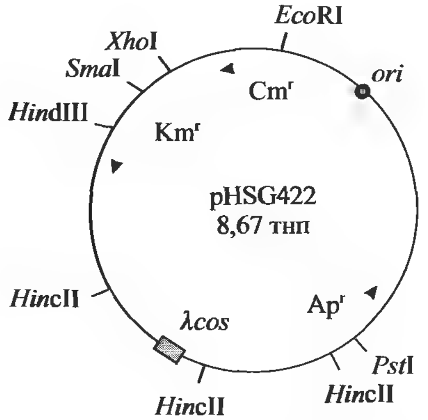


Рис. 2.3. Рестрикционные карты плазмиды pSC101 и низкокопийных клонирующих векторов, созданных на ее основе

ляции синтеза макромолекул, приводит к гибели бактериальной клетки. Поэтому такие гены необходимо клонировать в низкокопийных векторах. Для этой цели создан ряд производных плазмиды pSC101, рестрикционные карты двух из них представлены на рис. 2.3.

Плазмида ColE1 (рис. 2.4) оказалась более удобной для клонирования. С 1974 г. ее начали использовать в лаборатории X. Бойера в качестве вектора. Она имеет ослабленный контроль репликации, и при обычных условиях роста в клетке находится 20–30 копий плазмиды. После обработки хлорамфениколом копийность ColE1 достигает $1–3 \cdot 10^3$. При этом плазмидная ДНК составляет более половины всей ДНК клетки, что значительно упрощает процедуру выделения и очистки плазмиды. Относительно небольшие размеры (6,6 тпн) и наличие единственного места действия рестриктазы *Eco*RI обусловили широкое использование плазмиды ColE1 в качестве клонирующего вектора до появления более удобных векторов.

Плазмида ColE1 детерминирует одновременно способность клеток синтезировать колицин и иммунность этих же клеток к летальным дозам колицина. В районе между точками 5000 пн и 620 пн на плазмиде ColE1 расположены гены, кодирующие колицин E1, белок иммунности и белок Kil (см. рис. 2.4). Структурный ген колицина E1 — *cea* — кодирует полипептид размером 522 АК. Ген *kil* детерминирует полипептид длиной 45 АК. Гены *cea* и *kil* образуют единый оперон, транскрипция которого инициируется с промотора p_C. Белок Kil, по-видимому, за счет активации фосфолипазы А вносит нарушения в структуру внешней мембраны, что обусловливает освобождение колицина E1 из бактерий в окружающую среду. Клетки при этом не разрушаются. Синтез белка Kil в *E. coli* происходит на относительно низком уровне за счет частичной терминации транскрипции на ρ-зависимом терминаторе t_1 (см. 3.2). Более эффективная продукция белка Kil, вероятно, может привести к лизису клеток. Ген *imm* находится между генами *cea* и *kil*, и его транскрипция осуществляется в противоположном оперону *cea–kil* направлении. Связывание мРНК Imm с комплементарным участком мРНК Cea–Kil также приводит к снижению экспрессии гена *kil*.

К рассмотренному району примыкает область инициации и регуляции репликации плазмиды ColE1. Процесс репликации регулируется

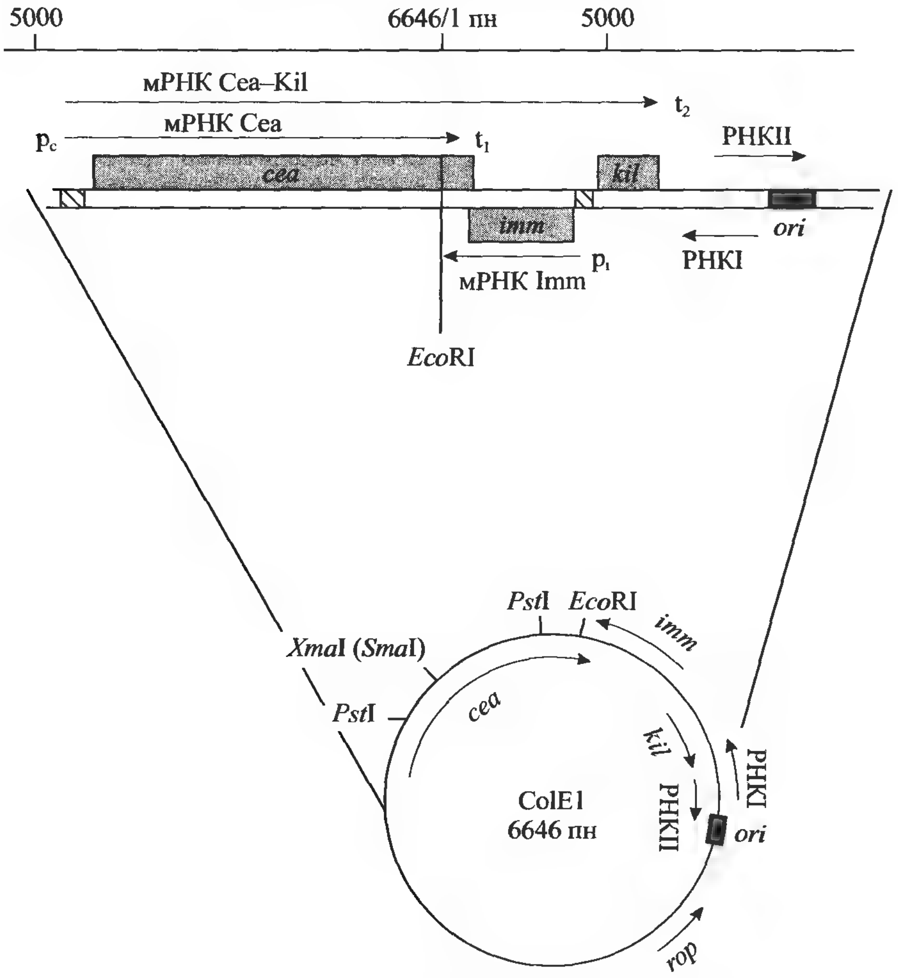


Рис. 2.4. Генетическая и рестрикционная карта плазмиды ColE1

синтезом двух типов молекул РНК — праймерной (обозначается РНКII, необходима для инициации репликации) и комплементарной ей (РНКI). Образуя дуплекс с РНКII, молекулы РНКI контролируют копийность плазмиды. Находящийся в непосредственной близости ген *rop* детерминирует синтез белка, который повышает эффективность связывания РНКI и РНКII и стабилизирует дуплекс. Амплификация плазмиды ColE1 в бактериях, обработанных хлорамфениколом, объясняется ингибированием синтеза белка Rop, метаболической нестабильностью РНКI и вовлечением предсуществующих клеточных белков репликации в синтез плазмидной ДНК, так как в этих условиях синтез бактериальной хромосомы прекращен.

При встройке экзогенных фрагментов ДНК по *Eco*RI-месту на ColE1 нарушается ген продукции колицина, но сохраняется ген иммунности к нему. По такому изменению фенотипа удается отбирать клоны клеток, содержащих гибридные плазмиды.

Отбор гибридных клонов осуществляют следующим образом. Препаратом ДНК, полученным после смешения фрагментов и их лигирования, трансформируют компетентные клетки *E. coli* и высевают их на агаризованную питательную среду, содержащую колицин E1. Клетки, давшие на такой среде начало бактериальным колониям, содержат либо исходную плазмиду ColE1, либо ее гибридные производные. Чтобы различить эти два типа клеток, проводят ряд последовательных процедур. На агаризованную питательную среду в чашках Петри равномерно наносят определенное количество культуры *E. coli*, чувствительной к колицину E1 (засеянные чашки). Затем колонии, устойчивые к колицину E1, перепечатывают единообразно на незасеянные и засеянные чашки. По истечении времени инкубации перепечатанные клоны образуют на чашках обоего типа колонии, а на засеянных чашках формируется также сплошной газон культуры *E. coli* Col^s. При этом вокруг колоний бактерий, продуцирующих колицин, наблюдается кольцевая прозрачная зона, где рост газона отсутствует. Такие клоны *E. coli* содержат нативную плазмиду ColE1, восстановившую свою структуру после рестрикции и ли-

гирования. Другие клоны должны содержать гибридные варианты ColE1, у которых в результате встройки ген продукции колицина поврежден.

Недостатком маркера иммунности к колицину является то, что клетки *E. coli* с относительно высокой частотой приобретают устойчивость к действию колицина в результате спонтанных мутаций и, кроме того, действие колицина существенно зависит от физиологического состояния клеток. Поэтому отбираемые по фенотипу клоны необходимо подвергать дополнительной проверке на наличие в клетках гибридных плазмид.

Как видим, первые векторные плазмиды pSC101 и ColE1 имели ряд недостатков. В этих плазмидах клонировали фрагменты ДНК только по *Eco*RI-месту, причем в обоих случаях отбор гибридных ДНК не очень прост. Поэтому в ряде лабораторий были развернуты исследования, направленные на создание более удобных клонирующих векторов на основе плазмид.

Плазмида pRSF2124 была получена в лаборатории С. Фалькова в результате транслокации *in vivo* транспозона Tn*3*, несущего ген устойчивости к ампициллину, из плазмиды RI в ColE1. Эта плазмида сохраняет тип репликации родительской плазмиды ColE1. Отбор клеток, содержащих плазмиду pRSF2124, не представляет трудностей, так как она обусловливает легко детектируемую устойчивость к ампициллину. Единственное место узнавания рестриктазы *Eco*RI находится внутри гена синтеза колицина, и при встройке фрагментов ДНК по этому месту плазмида детерминирует устойчивость клетки-хозяина к ампициллину, иммунитет к колицину и отсутствие способности к синтезу колицина. Наличие дополнительного селектируемого маркера (Ap^r) в плазмиде pRSF2124 делает ее более удобным вектором по сравнению с ColE1, так как упрощает отбор клонов клеток, содержащих гибридные плазмиды. К недостаткам этой плазмиды следует отнести довольно большой размер (11,1 тпн) и возможность клонирования фрагментов ДНК только по месту расщепления рестриктазой *Eco*RI.

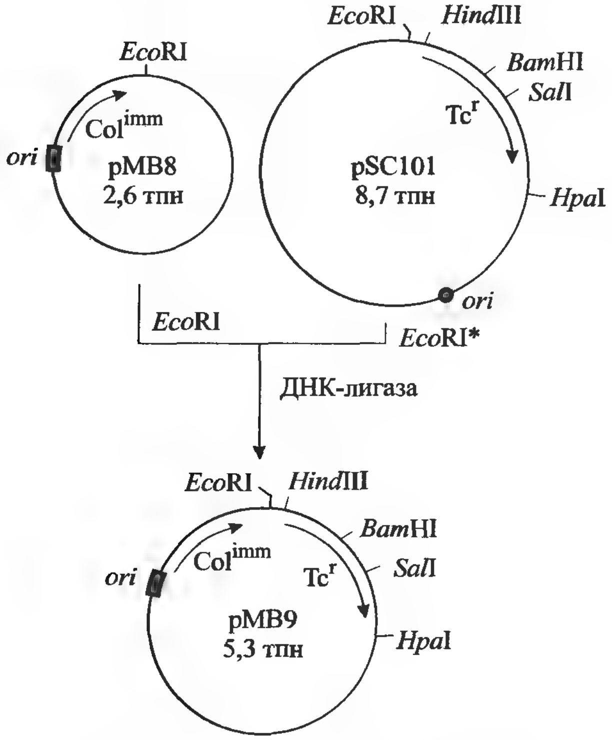


Рис. 2.5. Схема создания плазмиды pMB9.

Рестриктаза *Eco*RI узнает последовательность GAATTC, а в условиях *Eco*RI* — AATT. В обоих случаях образуются идентичные липкие концы

Конструирование плазмиды pMB9. Размер плазмиды ColE1 может быть значительно уменьшен, так как для ее репликации необходим только фрагмент ДНК величиной около 1 тпн. В лаборатории Х. Бойера были получены делеционные варианты ColE1, один из которых — pMB8 (2,6 тпн), описанный в 1976 г., стал основой для целой серии клонирующих векторов. Эта плазмида сохранила тип репликации родительской плазмиды ColE1, обладает иммунностью к колицину и имеет единственное место гидролиза рестриктазой *Eco*RI.

На основе pMB8 сконструировали *in vitro* новую плазмиду pMB9, в которую был перенесен ген устойчивости к тетрациклину из плазмиды pSC101. Плазмида pMB9 получена в результате лигазной обработки смеси линейной ДНК плазмиды pMB8, расщепленной рестриктазой *Eco*RI, и *Eco*RI*-фрагментов ДНК pSC101 с последующим отбором трансформантов с фенотипом Tc^r Col^{imm} (рис. 2.5). Плазмида pMB9 имеет размер 5,3 тпн и содержит в значимой области по одному месту действия для четырех рестриктаз: *Eco*RI, *Hin*dIII, *Bam*HI, *Sal*I. Эта плазмида обеспечивает устойчивость клеток к тетрациклину и иммунитет к колицину. При встройке фрагментов ДНК по участкам действия рестриктаз *Hin*dIII, *Bam*HI, *Sal*I нарушается ген устойчивости к тетрациклину, и гибридные плазмиды обусловливают фенотип клеток Tc^s Col^{imm}. При встройке по *Eco*RI-сайту фенотипическую селекцию осуществлять не удается. В этом случае необходимо использовать такие подходы, как гибридизация нуклеиновых кислот *in situ*.

Таким образом, плазмида pMB9 может быть использована для клонирования фрагментов,

генерируемых при гидролизе ДНК уже четырьмя различными рестриктазами. Недостатком pMB9 является то, что при встройке по участкам *Hin*dIII, *Bam*HI и *Sal*I отбор гибридов должен осуществляться по иммунитету к колицину E1, а этот тест, как уже отмечалось, не очень надежен. Поэтому сотрудниками лаборатории X. Бойера с 1977 по 1980 г. был проведен цикл экспериментов, в результате которых на основе pMB9 получены более совершенные векторные плазмиды серии pBR. Эти клонирующие векторы в последующем нашли широкое применение во многих лабораториях мира.

Конструирование плазмиды pBR313. Транслокацией *in vivo* транспозона Tn*3* (Ap[r]) из pRSF2124 в pMB9 были получены клоны клеток *E. coli*, имеющих фенотип Ap[r] Tc[r]. Электрофоретическим анализом гидролизованных *Eco*RI плазмид, выделенных из этих клеток, были выявлены молекулы ДНК размером 10,1 тпн, соответствующим сумме размеров Tn*3* (4,8 тпн) и pMB9. Трансформацией клеток *E. coli* было доказано, что эти плазмиды несут одновременно устойчивость к ампициллину и тетрациклину. Одна из полученных Ap[r] Tc[r] производных pMB9 была обозначена pBR312 (рис. 2.6). Эта плазмида несет два участка узнавания рестриктазы *Bam*HI, один из которых расположен в транслоцированном сегменте ДНК за пределами гена β-лактамазы (*bla*), определяющего устойчивость к ампициллину. Для того чтобы удалить этот *Bam*HI-участок и уменьшить размер плазмиды, ДНК pBR312 подвергли частичному гидролизу в условиях, изменяющих специфичность *Eco*RI на *Eco*RI* (см. 1.2.1). Затем эту ДНК ввели в клетки *E. coli* и осуществили скрининг клонов с фенотипом Ap[r] Tc[r] на наличие плазмиды с одним утраченным местом расщепления рестриктазой *Bam*HI. Наименьшая из выделенных таким образом плазмид была обозначена pBR313 и подвергнута дальнейшей характеризации. Размер ее ДНК составил 8,7 тпн.

Плазмида pBR313 содержит уникальные участки расщепления рестриктазами *Eco*RI, *Hin*dIII, *Bam*HI, *Sal*I, *Xma*I, *Sma*I и *Hpa*I (см. рис. 2.6). Фенотипическую селекцию гибридных ДНК можно осуществлять лишь при встройке фрагментов ДНК по участкам *Hin*dIII, *Bam*HI, *Sal*I, *Pst*I или при соединении фрагментов с векторной частью плазмиды, содержащей область начала репликации ДНК и полученной при гидролизе одновременно двумя рестриктазами, например, *Bam*HI — *Sma*I, *Eco*RI — *Hin*dIII, *Eco*RI — *Pst*I и т. п. При этом гибридные клоны *E. coli* будут иметь фенотип Ap[r] Tc[s] или Tc[r]Ap[s].

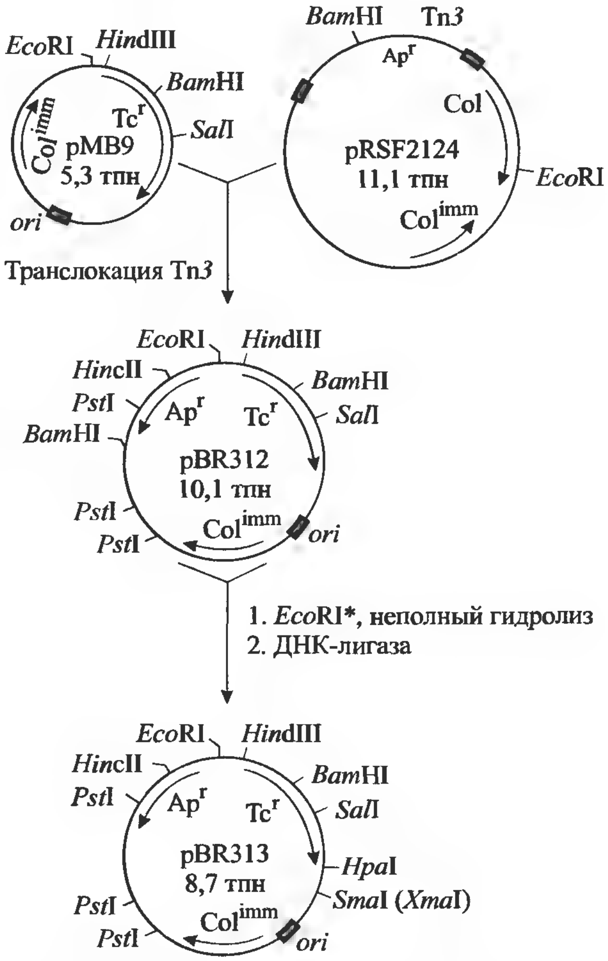


Рис. 2.6. Схема конструирования плазмиды pBR313

Конструирование плазмиды pBR322. Плазмида pBR313 имеет три места действия рестриктазы *Pst*I, одно из которых локализовано в гене устойчивости к ампициллину (см. рис. 2.6). В системе *in vitro* была сконструирована векторная плазмида pBR321, содержащая единственный участок гидролиза рестриктазой *Pst*I, локализованный в гене *bla*. Для того чтобы создать такой вектор, необходимо было предварительно получить производные pBR313. Плазмида pBR318 (Ap[s] Tc[r] Col[imm]), содержащая один *Pst*I-участок, была получена после трансформации клеток *E. coli* лигированной смесью ДНК плазмиды pBR313, подвергнутой гидролизу PstI, и отбора Ap[s] Tc[r] трансформантов (рис. 2.7). Другая производная плазмиды pBR313 — pBR320 (Ap[r] Tc[s] Col[s]) — была получена после трансформации клеток *E. coli* нелигированными *Eco*RII-фрагментами pBR313 и селекции требуемых вариантов. Из *Pst*I–*Hpa*I-фрагмента pBR318 и *Pst*I–HincII-фрагмента pBR320 была сконструирована *in vitro* плазмида pBR321 размером 4,7 тпн (см. рис. 2.7). Так как ген иммунности к колицину E1 не входил ни в один

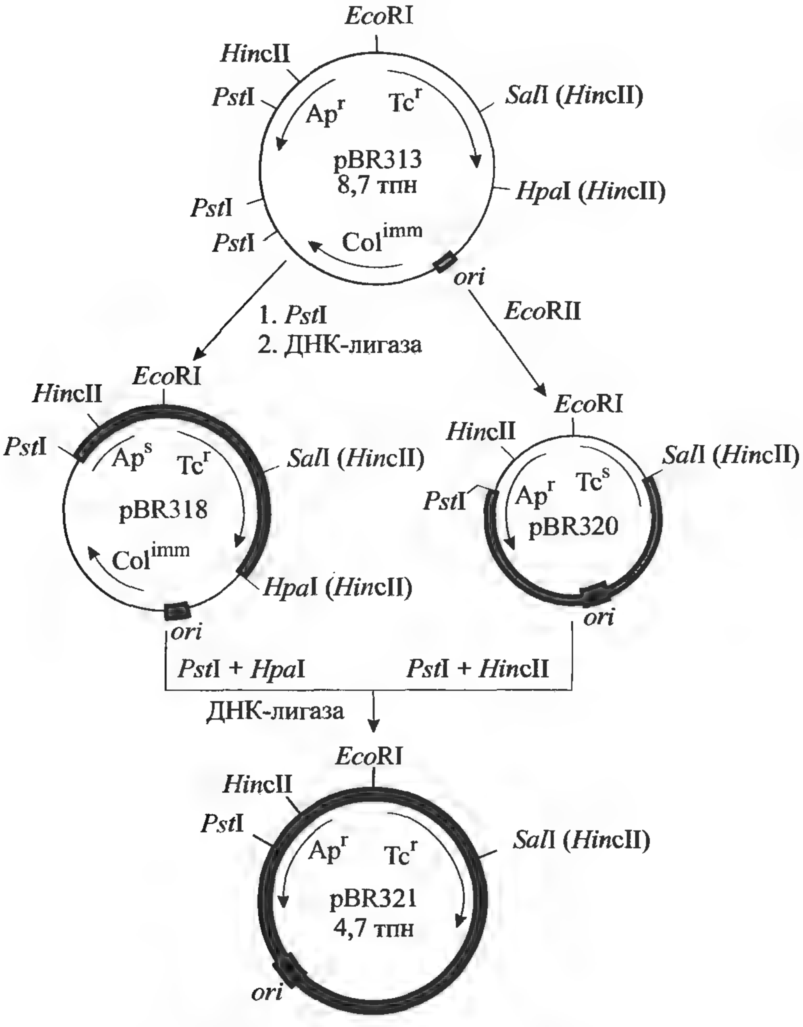


Рис. 2.7. Схема получения плазмиды pBR321.

Толстой линией обозначены сегменты плазмид, объединением которых получена pBR321. Участки узнавания рестриктаз: *Sal*I — G ↓ TCGAC, *Hpa*I — GTT ↓ AAC, *Hinc*II — GTPy ↓ PuAC

из этих фрагментов, отбор pBR321 осуществляли по фенотипу Ap^r Tc^r Col^s. Важно отметить, что в pBR321 часть транспозона Tn*3* делетирована, что препятствует его транслокации.

Случайно в этом эксперименте выявили делеционный вариант плазмиды pBR321, в котором не были нарушены ни гены устойчивости к антибиотикам, ни функция репликации. Эту плазмиду обозначили pBR322 (4,36 тпн). Для нее определена полная нуклеотидная последовательность, исходя из которой легко локализовать места расщепления любой рестриктазой (рис. 2.8). Плазмида pBR322 — удобный клонирующий вектор. Она имеет два селективных маркера Ap^r и Tc^r. Ни один из этих генов не является транспозоном и не может быть перенесен *in vivo* в другую плазмиду. pBR322 имеет уникальные участки расщепления рестриктазами *Vsp*I, *Pst*I, *Pvu*I и *Sca*I, расположенные в гене β-лактамазы, и *Hin*dIII, *Eco*RV, *Bam*HI, *Sal*I, *Sph*I, *Xma*III и *Nru*I, локализованные в детерминанте устойчивости к тетрациклину. Причем участок гидролиза *Hin*dIII не затрагивает структурную часть гена *tet*, а локализован в его промоторной области. После встройки фрагментов ДНК в pBR322 по указанным местам расщепления рестриктазами отбор гибридных клонов осуществляется в результате надежной селекции на средах с антибиотиками. Кроме того, на ДНК плазмиды pBR322 имеются уникальные места гидролиза рестриктазами *Eco*RI, *Pvu*II, *Bal*I, *Ava*I, *Tth*III, *Sna*I и *Nde*I, но они находятся за пределами генов устойчивости к антибиотикам.

Плазмида pBR322 оказалась настолько хорошим клонирующим вектором, что в течение ряда лет она использовалась в подавляющем большинстве генно-инженерных работ, в которых применялись плазмидные векторы. Кроме того, на основе плазмиды pBR322 получены другие векторные производные.

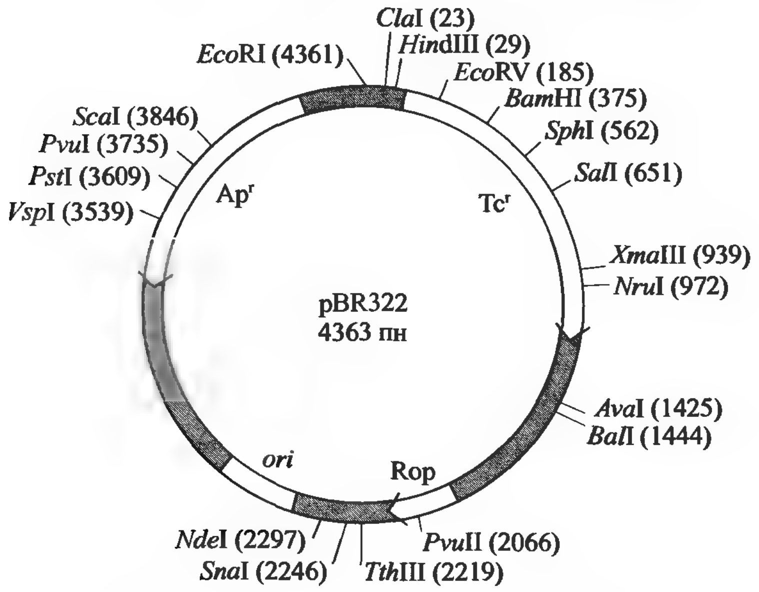


Рис. 2.8. Рестрикционная карта плазмиды pBR322.

За начало отсчета нуклеотидов принят центр участка узнавания рестриктазы *Eco*RI. Отсчет осуществляется по часовой стрелке. Для рестриктаз указан номер первой пары нуклеотидов участка узнавания фермента (см. рис. 2.14). Rop — белок, являющийся негативным регулятором копийности плазмиды

Конструирование плазмиды pBR325. Хотя pBR322 отвечает многим требованиям, предъявляемым к клонирующим векторам, она имеет и некоторые недостатки. Как уже отмечалось, при встройке фрагментов ДНК по *Eco*RI-месту плазмиды pBR322 гибридные клоны нельзя выявить фенотипически на средах с антибиотиками. Чтобы преодолеть этот недостаток, была сконструирована плазмида pBR325 (рис. 2.9). При ее создании использовали ДНК фага P1Cm^r, содержащего ген устойчивости к хлорамфениколу (ген хлорамфениколацетилтрансферазы — *cat*). Рестриктазой *Hae*II из фаговой ДНК выщепляли фрагмент, содержащий ген *cat*. Затем нуклеазой S1 гидролизовали одноцепочечные липкие концы, образованные *Hae*II, и получали фрагмент с тупыми концами. Этот фрагмент лигировали с расщепленными *Eco*RI и обработанными S1-нуклеазой линейными молекулами плазмиды pBR322. После трансформации клеток *E. coli* отбирали клоны с фенотипом Ap^r Tc^r Cm^r. Полученная таким образом плазмида pBR325 имеет единственное место гидролиза рестриктазой *Eco*RI в гене *cat*. Встройка по этому месту нарушает ген устойчивости к хлорамфениколу, и гибридные клоны легко выявляются по фенотипу Ap^r Tc^r Cm^s. Плазмида pBR325 в отличие от pBR322 имеет уже по два места действия рестриктаз *Pvu*II и *Bal*I, причем по одному из них приходится на ген *cat* (см. рис. 2.9). Остальные уникальные места узнавания рестриктаз плазмиды pBR322 сохранены и в pBR325.

Конструирование плазмид pBR327 и pBR328. Для удаления вторых участков узнавания рестриктаз *Pvu*II и *Bal*I на ДНК плазмиды pBR325, расположенных между областью начала репликации (*ori*) и геном *tet*, получили промежуточные делеционные производные плазмид pBR322 и pBR325. На первом этапе ДНК плазмиды pBR322 частично гидролизовали рестриктазой *Eco*RII. Продукты такого гидролиза обрабатывали нуклеазой S1, чтобы исключить негомологию получаемых липких *Eco*RII-концов в положении 1440 (CCTGG) и 2500 (CCAGG) на pBR322. Затем электрофоретически выделяли фрагменты плазмидной ДНК нужного размера, соединяли их с помощью ДНК-лигазы фага T4, вводили в клетки *E. coli* и отбирали трансформанты с фенотипом Ap^r Tc^r. После проверки отобранных трансформантов была выявлена плазмида, которую обозначили pBR327 (рис. 2.10). Размер этой плазмиды составил 3,27 тпн, а копийность в *E. coli* в три раза превышала копийность pBR322. Повышение копийности плазмиды обусловлено делецией гена *rop*. Таким образом, pBR327 — делеционный вариант плазмиды pBR322 — имеет некоторые преимущества перед исходной плазмидой, хотя в ней и утрачены места действия таких рестриктаз, как *Pvu*II и *Bal*I.

С использованием pBR327 был сконструирован делеционный вариант плазмиды pBR325 (см. рис. 2.10). Для этого плазмиды pBR325 и pBR327 гидролизовали рестриктазами *Pst*I и *Bam*HI, полученную смесь разделяли электро-

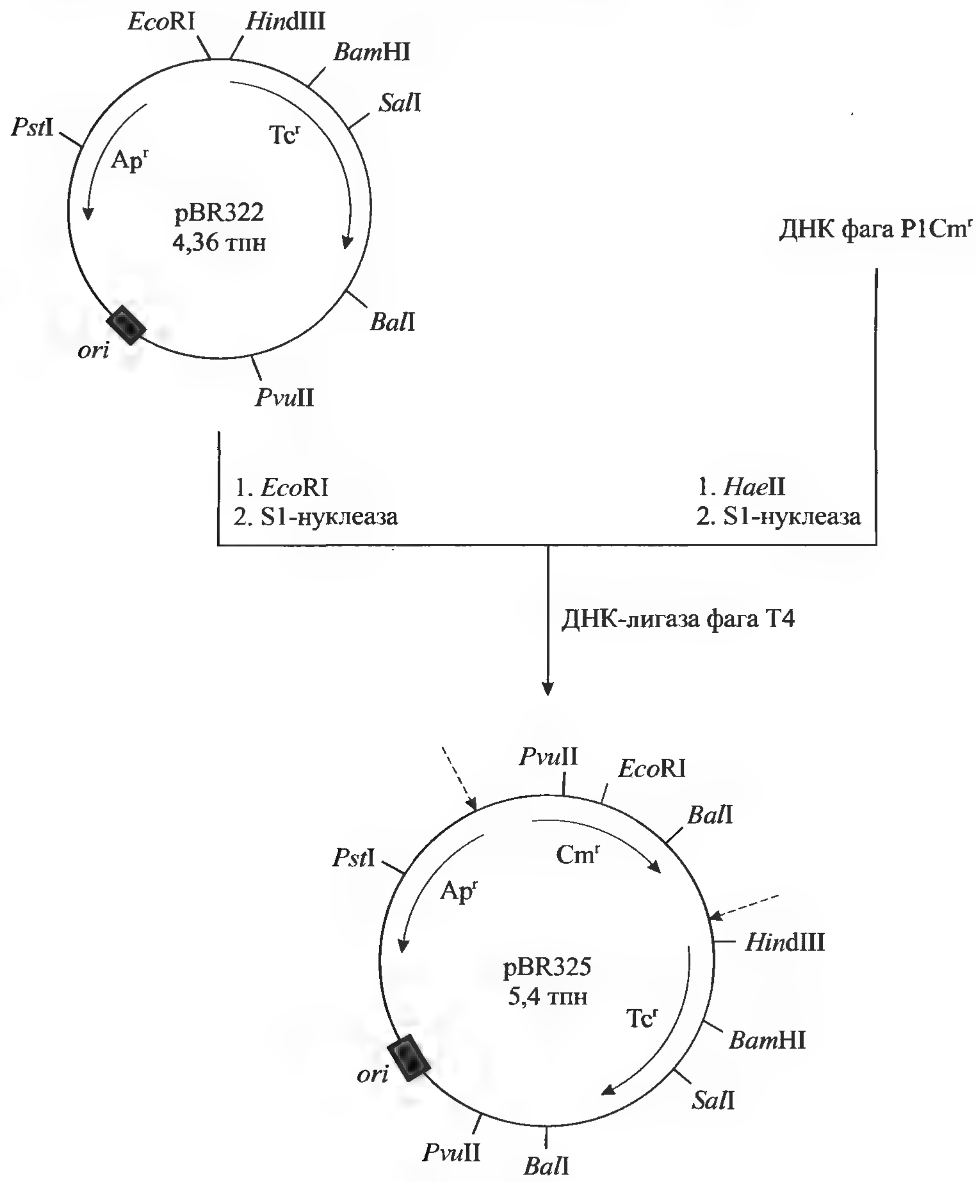


Рис. 2.9. Схема конструирования плазмиды pBR325.
Пунктирными стрелками обозначены границы встроенного в pBR325 фрагмента фаговой ДНК

форетически и фрагменты нужного размера элюировали из геля. Затем выделенные фрагменты pBR325 и pBR327 смешивали, лигировали, вводили в клетки и отбирали трансформанты с фенотипом Ap^r Tc^r Cm^r. Созданная таким образом плазмида pBR328 имеет размер 4,9 тпн и по спектру единичных мест расщепления рестриктазами не отличается от pBR322, но позволяет осуществлять фенотипический отбор гибридов при встройке по *Eco*RI-месту. Более того, плазмида pBR328 имеет копийность в клетке, схожую с pBR327.

Рассмотренные плазмиды серии pBR дают возможность клонировать и достаточно просто отбирать гибриды при встройке фрагментов ДНК по участкам расщепления векторной плазмиды рестриктазами *Eco*RI, *Pst*I, *Hin*dIII, *Bam*HI, *Sal*I, *Pvu*II, *Vsp*I, *Sph*I, *Sca*I, *Eco*RV, *Xma*III и *Nru*I. Вне селективных маркеров в этих плазмидах также находятся единичные места расщепления рестриктазами *Pvu*II, *Bal*I, *Ava*I, *Hpa*I, *Sma*I, *Xma*I, *Cla*I, *Tth*III, *Sna*I, *Nde*I.

Кроме того, фрагменты ДНК, генерированные рестриктазами *Bsp*RI или *Alu*I, могут быть клонированы в векторах серии pBR и затем выщеплены как *Eco*RI-, *Bam*HI- или *Sal*I-фрагменты. Этого можно достичь путем расщепления вектора одним из трех ферментов с последующей достройкой липких концов фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I до тупых и встройки *Bsp*RI- или *Alu*I-фрагментов по тупым концам с помощью ДНК-лигазы фага T4. При та-

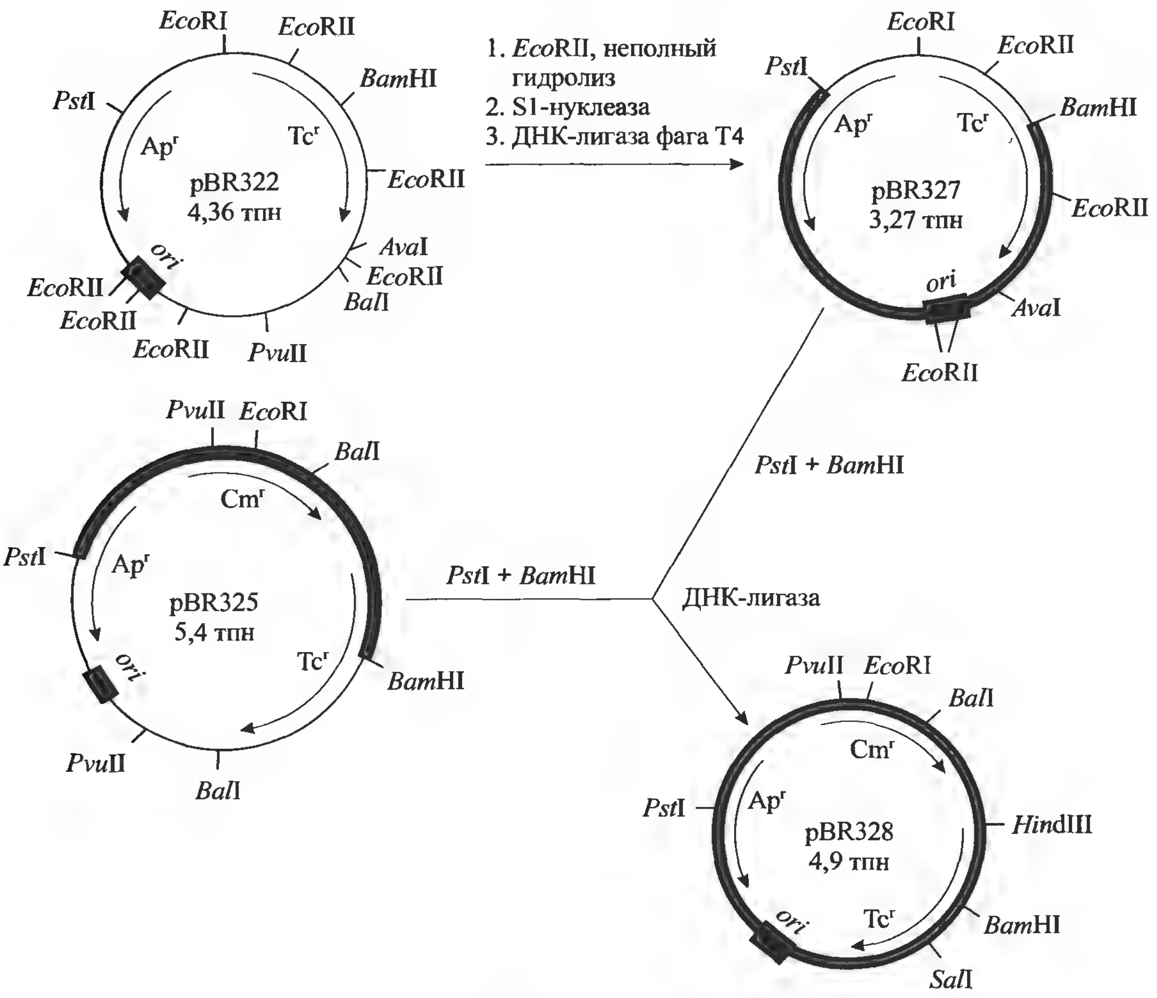


Рис. 2.10. Схема создания плазмид pBR327 и pBR328.

Толстой линией обозначены сегменты плазмид, объединением которых получена pBR328

кой встройке *Bsp*RI- или *Alu*I-фрагментов участки узнавания рестриктаз *Eco*RI, *Bam*HI или *Sal*I восстанавливаются, и клонированные фрагменты можно легко выщепить из состава гибридных ДНК:

5′...NNNGGATCCNNN... 3′ 5′...NNNAGCTNNN... 3′
3′...NNNCCTAGGNNN... 5′ 3′...NNNTCGANNN... 5′

1. *Bam*HI
2. PolIK

*Alu*I

5′...NNNGGATC 3′ 5′ CTNNN... 3′
3′...NNNCCTAG 5′ 3′ GANNN... 5′

ДНК-лигаза фага Т4

5′...NNNGGATCCTNNN... 3′
3′...NNNCCTAGGANNN... 5′
*Bam*HI

Таким образом, созданная серия векторов pBR позволяет клонировать широкий спектр сегментов ДНК.

Кроме рассмотренных получен целый ряд других плазмидных клонирующих векторов, и в зависимости от конкретных задач эксперимента постоянно конструируются новые варианты. Ранее отмечалось, что для амплификации плазмид с репликоном ColE1-типа необходимо ингибировать в клетке трансляцию путем добавления в среду хлорамфеникола. Для достижения в *E. coli* повышенной копийности клонированных генов без подавления белкового синтеза перспективно использовать плазмиды, имеющие термочувствительные мутации по функции репликации. Так, на основе фактора устойчивости к антибиотикам R1-drd19 Б. Юхлин с соавторами получили мини-плазмиды pKN402 и pKN410 (рис. 2.11), обладающие способностью к безудержной репликации при повышенной температуре. При температуре 28–30 °С они находятся в *E. coli* в количестве 20–50 копий на клетку. При температуре выше 35 °С они реплицируются без контроля копийности в течение 2–3 ч, после чего

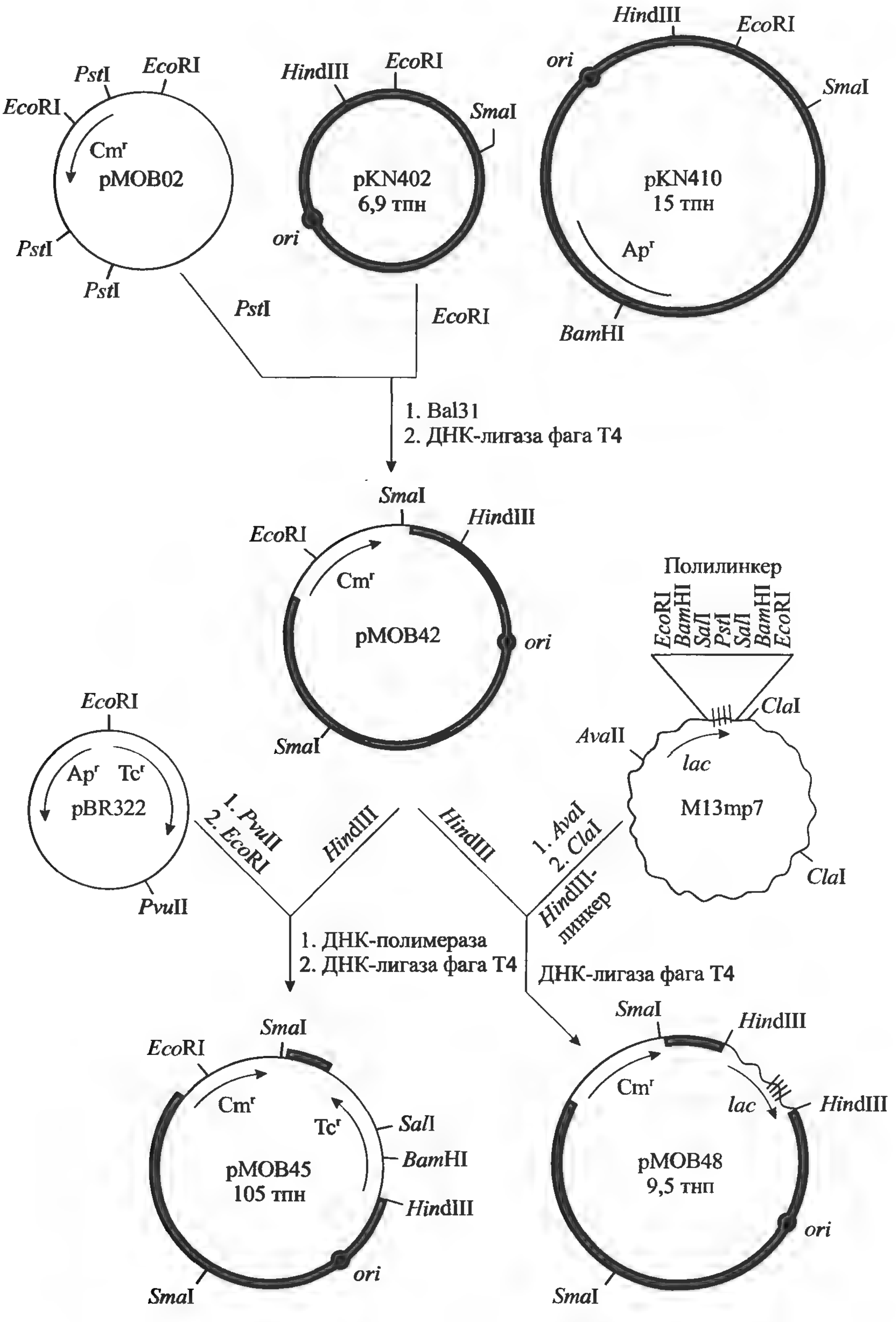


Рис. 2.11. Структура и схема конструирования векторных плазмид, способных к безудержной репликации

клетки гибнут. К этому времени количество плазмидной ДНК составляет около 75 % (!) от суммарной ДНК клетки. На основе pKN402 создан широкий спектр векторов, в частности плазмиды pMOB45 и pMOB48, которые также могут быть амплифицированы до высокого уровня температурной индукцией репликации (см. рис. 2.11).

Расширить спектр единственных мест действия рестриктаз на определенной плазмиде можно, встраивая в нее синтетический полилинкер, содержащий участки узнавания сразу

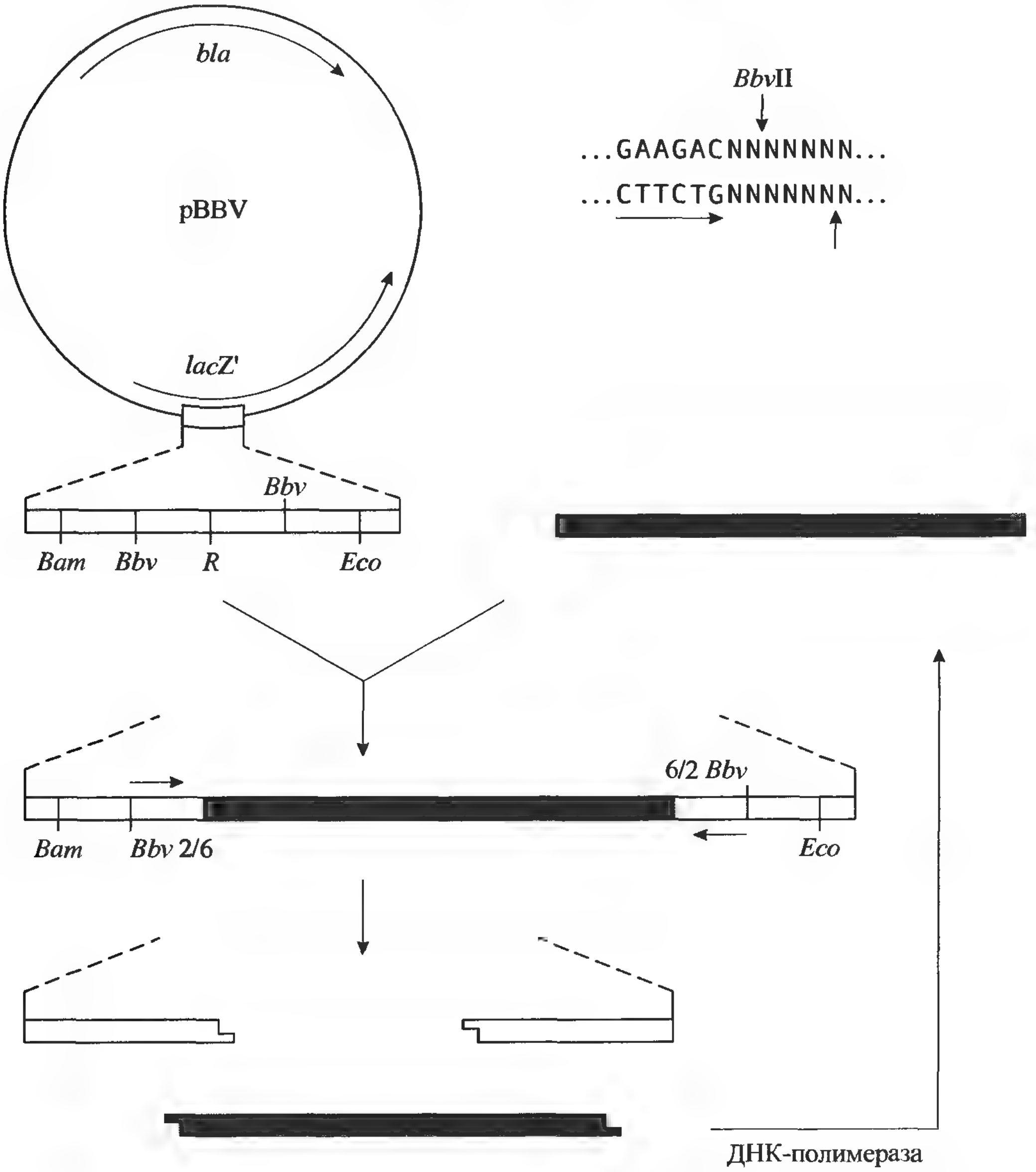


Рис. 2.12. Общая структура векторов pBBV и принципиальная схема их применения для клонирования и регенерации фрагментов ДНК.

Bbv — участок узнавания рестриктазы *Bbv*II, *Bam* — *Bam*HI, *Eco* — *Eco*RI, *R* — любой другой рестриктазы

нескольких рестриктаз. Крайним примером использования такого подхода может быть плазмида pJRD158, содержащая 28 уникальных мест действия разных рестриктаз.

В ряде случаев для клонирования фрагментов ДНК необходимы плазмиды, содержащие специальным образом введенные участки узнавания рестриктаз подкласса IIS, которые гидролизуют молекулы ДНК на некотором расстоянии от этих участков (см. табл. 1.4). Первые плазмиды такого типа созданы в 1984 г. В. Н. Добрыниным с соавторами для эндонуклеазы *Bbv*II. Этот фермент расщепляет ДНК в положении 2/6 (места расщепления соответственно верхней и нижней цепей) справа от последовательности GAAGAC с образованием тетрануклеотидных одноцепочечных концов (рис. 2.12). Данное свойство рестриктазы *Bbv*II использовано для решения задачи точного выщепления клонированных по тупым концам фрагментов ДНК из состава гибридных плазмид. Для этого в плазмиду pUR222, не имеющую мест гидролиза *Bbv*II, встроили синтетические сегменты ДНК, которые содержали по два участка узнавания *Bbv*II противоположной полярности, а между ними — участок узнавания какой-либо другой рестриктазы (см. рис. 2.12). Один из векторов данного типа — pBBV21 — получен встраиванием в pUR222 следующего синтетического сегмента (приведена одна цепь):

*Bam*HI *Bbv*II → *Sma*I *Eco*RI
GGATCCGAAGACCCGGGTCTTCGAATTC
← *Bbv*II

По *Sma*I-участку pBBV21 можно клонировать любые фрагменты ДНК с тупыми концами, а затем точно выщеплять их из гибридной молекулы. При клонировании синтетических дуплексов в pBBV21 можно планировать их структуру таким образом, что после вырезания из гибридной плазмиды с помощью рестриктазы *Bbv*II они будут иметь уникальные, заранее заданные выступающие одноцепочечные 5′-концы. В таком векторе можно клонировать ряд синтетических субфрагментов определенного гена и после гидролиза *Bbv*II получить набор этих субфрагментов, каждый из которых будет иметь уникальные и разные правый и левый концы. Если синтез спланировать так, чтобы все соседние сегменты в месте стыковки имели комплементарные одноцепочечные концы, то субфрагменты в лигазной реакции будут соединяться только в заранее заданном порядке. Это значительно упрощает процедуру сборки протяженных синтетических последовательностей ДНК.

Улучшенными свойствами по сравнению с векторами серии pBBV обладают плазмиды pMB123 и pMB124 (рис. 2.13), созданные А. Н. Синяковым с сотрудниками на основе pUR222 и предназначенные для вырезания клонированных фрагментов рестриктазами подкласса IIS *Fok*I и *Hga*I. Авторы продемонстрировали эффективность рассмотренного подхода при сборке синтетической последовательности гена интерлейкина 2 человека.

Несомненный интерес представляют векторные молекулы, позволяющие осуществлять прямой отбор генетических элементов, регулирующих экспрессию генов в выбранном типе клеток. Наибольшие успехи в данном направлении исследований на *E. coli* достигнуты при создании векторных плазмид для отбора промоторсодержащих фрагментов ДНК (о промоторах подробнее см. 3.2). После того как было показано, что участок гидролиза рестриктазой *Hin*dIII в плазмидах серии pBR локализован между областями –35 и –10 промотора гена *tet* (рис. 2.14), стало ясно, что данный промотор можно инактивировать либо делецией последовательностей, прилегающих к *Hin*dIII-участку, либо внедрением по этому участку сегментов ДНК. Встраиванием синтетических линкеров можно одновременно осуществлять инактивацию промотора гена *tet* и введение удобных рестрикционных участков. Если по этим участкам встроить фрагменты ДНК, направляющие транскрипцию в сторону структурного гена *tet*, то будет синтезироваться мРНК, содержащая природный участок связывания рибосом (RBS), и гибридная плазмида будет обусловливать устойчивость клеток к тетрациклину.

Этим методом в ряде лабораторий были созданы плазмиды, пригодные для отбора промоторсодержащих фрагментов ДНК по обусловливаемому ими изменению фенотипа клеток

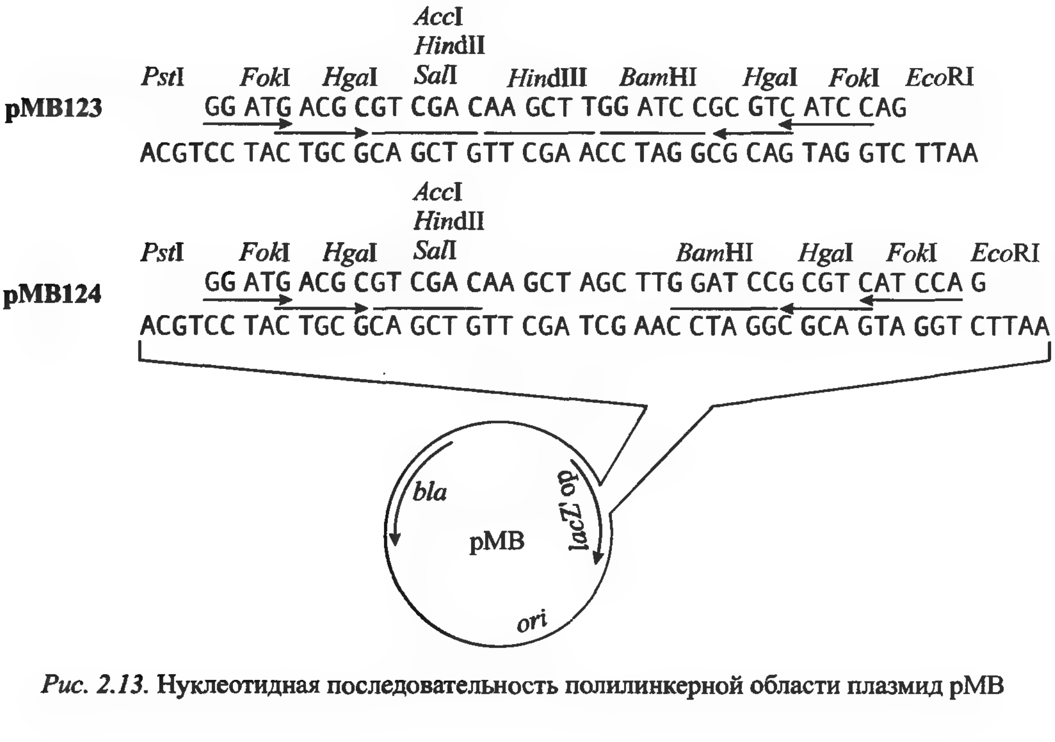


Рис. 2.13. Нуклеотидная последовательность полилинкерной области плазмид pMB

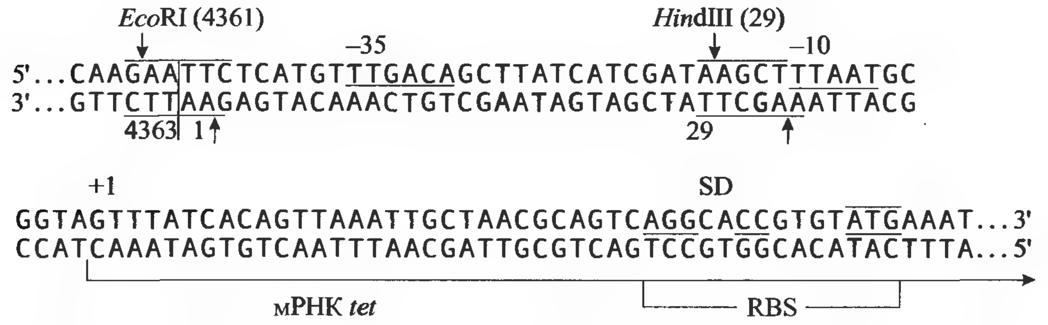


Рис. 2.14. Последовательность нуклеотидов в 5′-концевой части гена *tet* плазмид серии pBR

E. coli с Tc^s на Tc^r. Во многом аналогично сконструированы плазмиды *E. coli*, содержащие ген хлорамфениколацетилтрансферазы (*cat*), у которого делетирован промотор, но сохранена структурная часть. Эти плазмиды также обеспечивают возможность клонирования последовательностей ДНК, которые в клетках *E. coli* функционируют как промоторы. По степени устойчивости к антибиотику, детерминируемой гибридными промоторсодержащими плазмидами, можно осуществлять косвенную оценку эффективности функционирования отобранных промоторов.

Наряду с рассмотренными создан широкий спектр других типов плазмидных векторов (см. 2.2.7–2.2.9).

2.2.2. Молекулярные векторы на основе ДНК фага лямбда

К моменту появления методологии генетической инженерии колифаг λ по сравнению с другими вирусами бактерий был наиболее полно изучен генетически и молекулярно-биологически. Это и обусловило то, что наряду с плазмидными векторами уже в 1974 г. появилась серия клонирующих векторов на основе фага λ.

В зрелых вирионах фага λ ДНК находится в виде двухцепочечной линейной молекулы размером 48 502 пн. На концах молекулы ДНК имеются взаимокомплементарные GC-обогащенные одноцепочечные концы длиной 12 нуклеотидов (обозначаются как *cos*R и *cos*L). Сразу после попадания в клетку фаговая ДНК циклизуется по этим концам и функционирует в клетке в кольцевой форме. Район ковалентно зашитых *cos*R и *cos*L называется ***cos-сайтом***. Фаг λ является умеренным фагом, т. е. в зависимости от условий может развиваться в клетке либо по литическому, либо по лизогенному пути.

При литическом развитии происходит лизис клеток и образуются инфекционные фаговые частицы, при лизогенном молекула ДНК фага λ интегрируется в бактериальную хромосому преимущественно в одно место между генами *gal* и *bio* и находится в так называемом состоянии ***профага***. Штамм, лизогенный по какому-либо умеренному фагу, обозначается следующим образом: за обычным наименованием бактериального штамма в круглых скобках указывается лизогенизирующий фаг, например, *E. coli* C600(λcI_{857}).

Геном фага λ можно разделить на три основные части (рис. 2.15). Левая часть включает все гены (от *Nu*1 до *J*), белковые продукты которых необходимы для формирования капсидов и упаковки в них молекул фаговой ДНК. Центральная часть, расположенная между генами *J* и *N*, несущественна для литического развития фага в клетке-хозяине дикого типа. Эта область генома содержит гены, участвующие в общей рекомбинации фага (*redα* и *redβ*), сайтспецифической интеграции ДНК фага в бактериальную хромосому (*int*) и исключении профага из хромосомы (*xis*). Сайтспецифические рекомбинационные события происходят по особым участкам на ДНК фага (*att*) и бактериальной хромосомы. Правая часть генома фага λ содержит все остальные контролирующие элементы, к которым, в частности, относятся гены, необходимые для репликации фаговой ДНК (*O* и *P*) и для лизиса клеток (*S* и *R*).

Существенные для литического развития фага гены транскрибируются с трех основных промоторов: p_L, p_R и $p_{R'}$ (см. рис. 2.15). При развитии по лизогенному пути репрессор фага λ (продукт гена *c*I) связывается с операторами o_L и o_R, предотвращая транскрипцию с p_L и p_R. При литическом развитии фага транскрипция идет с p_L влево через ген *N* и с p_R вправо через ген *cro*. В отсутствие продукта гена *N* транскрипция в значительной степени терминируется сразу после этих генов на участках t_L и t_{R1}. Второй терминирующий участок t_{R2} полностью предотвращает дальнейшую транскрипцию с промотора p_R. Продукт гена *N* осуществляет свою функцию положительного регулятора че-

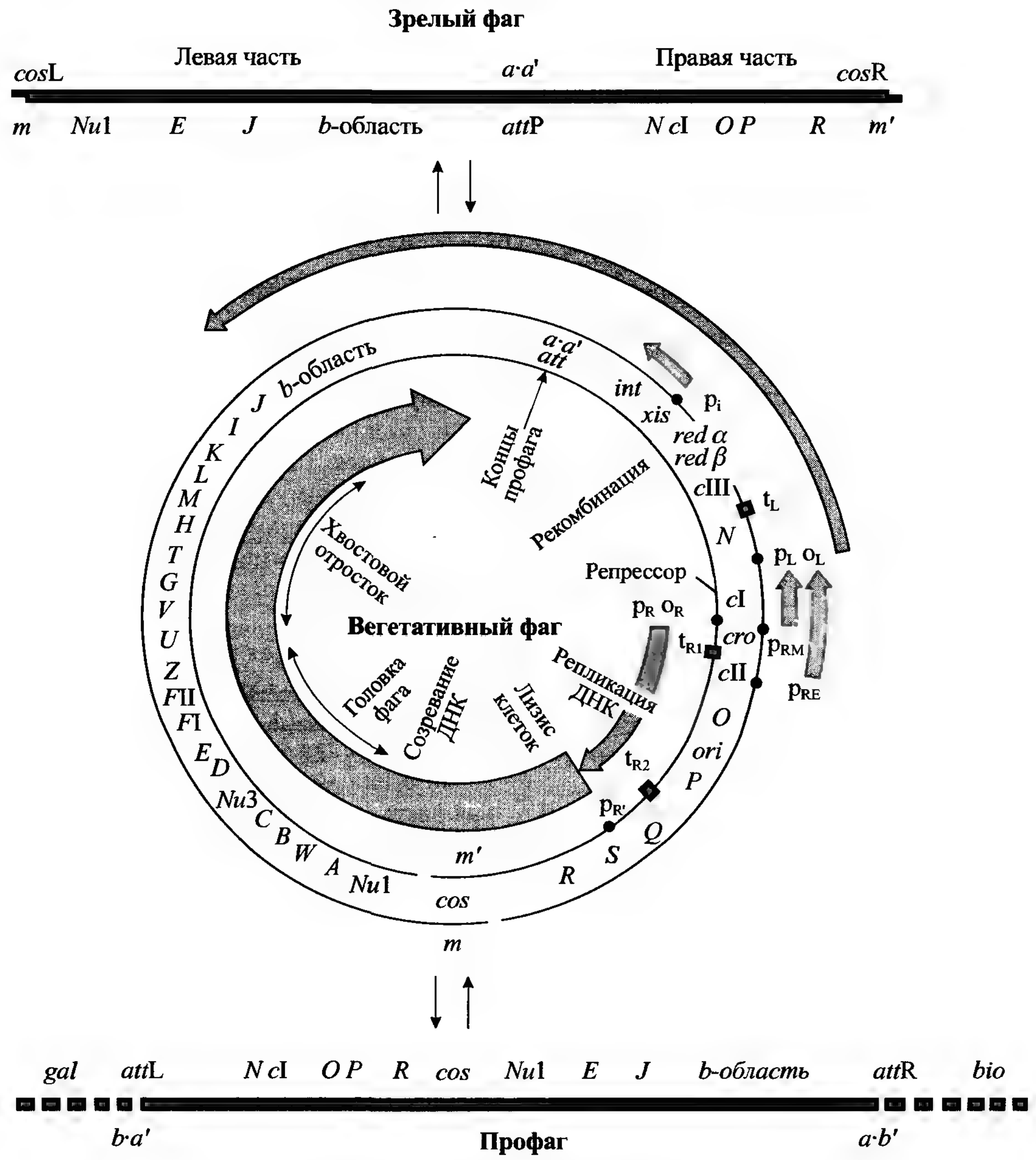


Рис. 2.15. Карта генома фага λ.

Прописными буквами обозначены жизненно важные гены фага, строчными — несущественные для его литического развития; заштрихованные стрелки — единицы транскрипции фагового генома (скриптоны), ширина стрелок отражает интенсивность транскрипции соответствующих районов генома; толстая штриховая линия (гены *gal* и *bio*) — хромосомная ДНК *E. coli*; p — промотор; o — оператор; t — терминатор транскрипции

рез взаимодействие с РНК-полимеразой клетки, в результате чего такой модифицированный фермент способен преодолевать сигналы терминации транскрипции на фаговой ДНК. Белковый продукт гена *cro* имеет функции антирепрессора, и когда в клетке достаточно высока его концентрация, происходит дерепрессия транскрипции с p_L и p_R. В присутствии белка N транскрипция с p_L идет до *b*-области, а с промотора p_R — через гены *O*, *P* и *Q*. Продукт последнего гена необходим для транскрипции поздних генов фага λ с *Q*-зависимого промотора $p_{R'}$. Так как при инфекции ДНК фага циклизуется, транскрипция с $p_{R'}$ идет через гены *S*, *R*, *A* вплоть до гена *J*.

Синтезирующиеся структурные белки образуют две основные единицы зрелой фаговой частицы — головку и хвостовой отросток, сборка которых происходит независимо. При формировании головки фага первоначально образуется так называемая преголовка, в которую затем пакуется фаговая ДНК. В клетке фаговая ДНК в результате репликации находится в конкатемерной форме, т. е. на одной гигантской молекуле ДНК последовательно расположено несколько полных фаговых геномов. С *cos*-сайта-

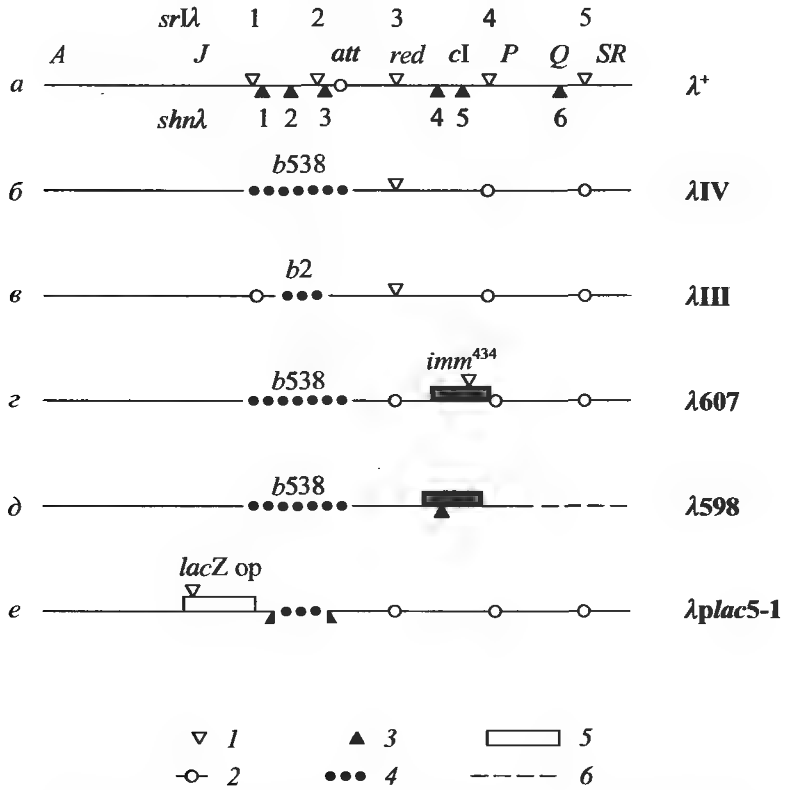


Рис. 2.16. Структура векторов внедрения на основе ДНК фага λ:

1 — участок гидролиза рестриктазой *Eco*RI; *2* — мутированный участок гидролиза *Eco*RI; *3* — участок гидролиза *Hin*dIII; *4* — делеция; *5* — фрагмент хромосомной ДНК *E. coli*; *6* — район генома фага λ, рекомбинационно замещенный соответствующим районом фага φ80; *imm*^{434} — область иммунности лямбдоидного фага 434, рекомбинационно введенная в геном фага λ

ми на этой ДНК связываются фаговые белки Nu1 и А. Эти белки обеспечивают нарезание фаговой ДНК в *cos*-сайтах с образованием одноцепочечных липких концов (*cos*R и *cos*L) и упаковку фаговых геномов в преголовку. В результате формируется головка фага, которая, соединяясь с хвостовым отростком, образует зрелую фаговую частицу. Белковые продукты генов *R* и *S* обеспечивают лизис клеточной стенки, в результате чего происходит выход в среду фагового потомства.

Приведенное здесь описание функционирования генома фага λ является кратким и схематичным. В то же время оно показывает, что фаг λ имеет достаточно сложную, но хорошо изученную генетическую организацию. Для многих мутантов фага λ разработаны простые методы тестирования, продемонстрирована возможность получения жизнеспособных делеционных вариантов. Изучен ряд близкородственных лямбдоидных фагов, а также их рекомбинантов с фагом λ и между собой, возникающих *in vivo* при совместном инфицировании клеток *E. coli*. Все это стимулировало исследования по использованию фага λ и некоторых его рекомбинантов с лямбдоидными фагами в качестве клонирующих векторов.

На ДНК фага λ имеется пять мест расщепления рестриктазой *Eco*RI (рис. 2.16, *а*), причем три из них (*srI*λ1 – *srI*λ3) находятся в области генов, несущественных для литического развития фага. Для рестриктазы *Hin*dIII на ДНК бактериофага λ имеется шесть мест действия, и пять из них (*shn*λ1 – *shn*λ5) — в области несущественных генов.

Получение векторных молекул на основе ДНК фага λ сводится к введению мутаций по участкам действия рестриктаз в существенной для размножения фага области генома с сохранением их в несущественной области. Поскольку клетки *E. coli*, обладающие системой рестрикции–модификации *Eco*RI, пермиссивны для фага λ, именно для рестриктазы *Eco*RI были получены первые векторные фаги λ. Это обусловлено тем, что мутанты фага λ по местам действия рестриктазы *Eco*RI можно достаточно просто получать и отбирать в системе *in vivo*. Схема данного подхода состоит в следующем. Фагом λ попеременно инфицируют клетки *E. coli*, имеющие систему рестрикции–модифи-

кации *Eco*RI и не имеющие таковой. Возникающие спонтанно или в результате мутагенеза мутанты, потерявшие некоторые из участков действия рестриктазы, имеют селективное преимущество перед исходным фагом при размножении на штамме с системой рестрикции–модификации, так как мутантный фаг с большей вероятностью выживает на рестриктирующем штамме за счет конкурентной модификации имеющихся на ДНК мест рестрикции.

Г. А. Щелкуновой и С. Н. Щелкуновым показано, что среднее ограничение фага λ *in vivo* системой рестрикции–модификации *Eco*RI по каждому из пяти участков воздействия на фаговую ДНК составляет 5,6. У мутантного варианта, имеющего лишь три *Eco*RI-участка, при инфицировании рестриктирующего штамма *E. coli* будет выживать и давать начало фаговому потомству одна молекула ДНК из 180. Для фага дикого типа (пять *Eco*RI-участков) это соотношение будет 1 из 5,5 тыс. молекул. Фаговое потомство, полученное на штамме с R–M-системой, имеет метилированную ДНК. Для того чтобы снять эту модификацию, популяцию фагов с рестриктирующего штамма пассируют на штамме без системы рестрикции–модификации и затем снова проводят через рестриктирующий штамм. После нескольких таких циклов мутанты фага по местам действия рестриктазы в силу своего селективного преимущества вытесняют из популяции исходный фаг.

По такой схеме были получены первые векторные фаги λ для клонирования *Eco*RI-фрагментов (см. рис. 2.16, *б, в*; 2.17, *а, б*). Для конструирования векторов, содержащих участки гидролиза другими рестриктазами, такой подход неприемлем, так как фаг λ не способен размножаться на бактериях, обладающих соответствующими системами рестрикции–модификации. В этом случае возможны другие методы создания векторных ДНК. Так, для рестриктазы *Hin*dIII вектор был получен путем рекомбинационной замены сегмента ДНК фага λ, содержащего *shn*λ6, на гомологичную область ДНК близкородственного лямбдоидного фага φ80, не имеющую *Hin*dIII-места гидролиза (см. рис. 2.16, *д*).

Необходимо отметить, что жизнеспособность вариантов фага λ резко снижается, когда размер их генома составляет более 105 или менее 78 % генома фага дикого типа. Поэтому каждый конкретный векторный фаг имеет ограничения по размеру фрагментов ДНК, которые можно в нем клонировать. Суммарный размер ДНК гибридных фагов должен находиться в интервале 38–51 тпн.

Существующие в настоящее время векторные фаги λ для каждой конкретной рестриктазы делят на векторы внедрения и векторы замещения. ***Векторы внедрения*** имеют на ДНК одно место действия для данной рестриктазы. Если при встройке экзогенного фрагмента ДНК в этот сайт происходит нарушение какого-либо гена исходного фага, селекция гибридных клонов осуществляется как выявление соответствующих фаговых мутантов. Рассмотрим типичных представителей этой группы векторов.

Первый λ-вектор внедрения был получен в лаборатории Н. Муррея на основе делеционного фага λb538 (см. рис. 2.16, *б*). Вставка фрагмента ДНК в *sr*Iλ3 повреждает ген *redα* этого фага, давая потомство с фенотипом Red . Такие фаги можно детектировать по их резко сниженной способности расти на штаммах *E. coli*, мутантных по генам *pol*A или *lig*. Для этого все негативные колонии фага, образовавшиеся на бактериальном газоне после трансфекции клеток *E. coli* фаговой ДНК, переносят последовательно по трафарету на чашки со свежезасеянными газонами *E. coli* штаммов lig^+ (или $polA^+$) и lig^- (или соответственно $polA^-$). Те фаговые клоны, которые дают активный рост (образуют зону лизиса в месте укола) лишь на первом штамме, должны быть гибридными вариантами фага λ (имеют фенотип Red^-). Однако гибридная природа каждого фагового клона может быть доказана только дополнительными анализами молекул ДНК (гибридизация, рестрикционный анализ). Как видим, этот тест недостаточно однозначен и кроме того трудоемок. Он не позволяет осуществлять прямой отбор гибридных фаговых клонов.

Значительно удобнее в работе *Eco*RI- и *Hin*dIII-векторы внедрения на основе фага λ, у которых встройка фрагмента ДНК повреждает ген репрессора (см. рис. 2.16, *г, д*). В этом случае векторы были получены на основе фага λimm^{434} (рекомбинантный фаг λ, содержащий область иммунности лямбдоидного фага 434). Встройка фрагментов ДНК в ген *c*I фага λimm^{434} выявляется по характерной морфологии бляшек (прозрачные у гибрида и с мутным центром у исходного фага). Кроме того, удобный вектор внедрения с системой прямого фенотипического отбора гибридов получен на основе трансдуцирующего фага λ*plac*5 (см. рис. 2.16, *е*). При встройке экзогенной ДНК в геном векторного фага λ*plac*5-1 по единственному *Eco*RI-месту нарушается ген β-галактозидазы (*lacZ*), что легко детектируется в прямом тесте титрования фагов на газоне *E. coli lacZ* на чашках с инди-

каторным красителем. β-Галактозидаза катализирует расщепление лактозы на глюкозу и галактозу, что приводит к закислению окружающей среды. Изменение pH можно легко выявить на питательной среде с лактозой и с индикаторным красителем бромкрезоловым пурпурным (среда Мак-Конки). На такой среде темно-красного цвета векторный фаг λp*lac*5-1 сбраживает лактозу, и бляшки, образуемые им при титровании на газоне *E. coli lac*Z$^-$, имеют желтое окрашивание и окружены желтым ореолом. Гибридные фаги на основе λp*lac*5-1 активную β-галактозидазу не синтезируют и в описанных условиях формируют бляшки без изменения окраски агаризованной питательной среды.

При другом способе фенотипического выявления гибридов на основе фага λp*lac*5-1 в питательную среду, на которой титруют препарат фага, добавляют 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-*D*-галактозид (обозначаемый Xgal). Данное соединение само по себе бесцветно. Однако при его гидролизе β-галактозидазой образуется ярко-синий 5-бром-4-хлориндиго. Поэтому бляшки векторного фага λp*lac*5-1 на газоне *E. coli lac*Z$^-$ в присутствии Xgal будут окрашиваться в синий цвет, а гибридные варианты будут формировать бесцветные бляшки.

Широкое распространение в последние годы получил вектор внедрения λgt11, очень схожий с λp*lac*5-1. Фаг λgt11 (*lac*5cI$_{857}$*nin*5*Sam*) имеет термочувствительный репрессор (cI$_{857}$) и амбер-мутацию (см. 6.4) по гену *S*, делающую его не способным к лизису хозяйской клетки, не имеющей супрессора *sup*F. Фаг λgt11 обычно используют в качестве экспрессирующего вектора при встройке в него по *Eco*RI-участку ДНК-копий матричных РНК. При совпадении трансляционной рамки встроенной кДНК с рамкой гена β-галактозидазы синтезируется химерный белок, на С-конце которого располагается последовательность чужеродного белка. Многочисленные эксперименты показали, что чужеродные белки в составе химеры с β-галактозидазой в основном сохраняют свои иммунохимические свойства. Поэтому после упаковки *in vitro* и высева на бактериальный газон полученные клоны фагов (бляшки) можно подвергнуть радиоиммуноанализу *in situ* с целью поиска гибридов, содержащих кДНК строго определенной мРНК (для белкового продукта которой имеются антитела).

Векторы замещения имеют два или больше мест действия рестриктазы на молекуле фаговой ДНК. Заключенные между этими участками фрагменты векторной ДНК замещаются донорными фрагментами ДНК. При этом происходит делеция ряда генов фага, что детектируется соответствующими генетическими методами. Необходимо подчеркнуть, что делетироваться могут только гены, несущественные для литического развития фага (область от гена *J* до гена *N*). На ДНК фагов, у которых отсутствует терминатор транскрипции t$_{R2}$ (делеция *nin*5), размер делеции может быть увеличен вплоть до промотора p$_R$. В этом случае фаг будет жизнеспособным, несмотря на удаление жизненно важного в обычных условиях гена *N*, детерминирующего белок-антитерминатор. Рассмотрим некоторые из векторов замещения на основе фага λ.

До разработки более совершенных векторных фагов самыми популярными векторами замещения на основе фага λ, предназначенными для клонирования *Eco*RI-фрагментов, являлись штаммы λgt-λC, λgt-λB (см. рис. 2.17, *а, б*), в которые можно встраивать *Eco*RI-фрагменты ДНК размером до 15,1 тпн. Популярность этих векторов обусловлена тем, что их векторная часть λgt-0 (правый и левый концы ДНК фага без внутреннего *Eco*RI-фрагмента) не образует жизнеспособного фагового потомства, так как молекула ДНК λgt-0 слишком короткая. Гибридные же ДНК дают жизнеспособное фаговое потомство.

Получен вариант фага λ, в ДНК которого можно встраивать *Eco*RI-фрагменты размером до 24 тпн (см. рис. 2.17, *в*), что составляет примерно половину гибридной фаговой ДНК и близко к предельному размеру возможной вставки в геном фага λ. Гибридные фаги на основе этого вектора легко отбираются по бляшкообразованию на газоне клеток *E. coli*, лизогенных по фагу P2, так как мутанты фага *red*$^-$*gam*$^-$ размножаются на *E. coli*(P2), в то время как фаг λ, не имеющий такой двойной мутации (делеции), на указанном лизогене бляшек не образует.

Удобны векторы замещения на основе трансдуцирующих фагов λ (см. рис. 2.17, *г–е*). При встраивании в эти векторы экзогенной ДНК обычно из фаговой ДНК удаляются фрагменты, в состав которых входят трансдуцируемые этим фагом бактериальные гены. Гибриды выявляются на соответствующих мутантных бактериальных клетках как фаги, утратившие бактериальный ген и поэтому уже не комплементирующие мутацию в клетке-хозяине.

Уточнение карты расщепления ДНК фага λ рядом крупнощепящих рестриктаз после расшифровки в 1983 г. полной последовательности нуклеотидов фагового генома позволило рас-

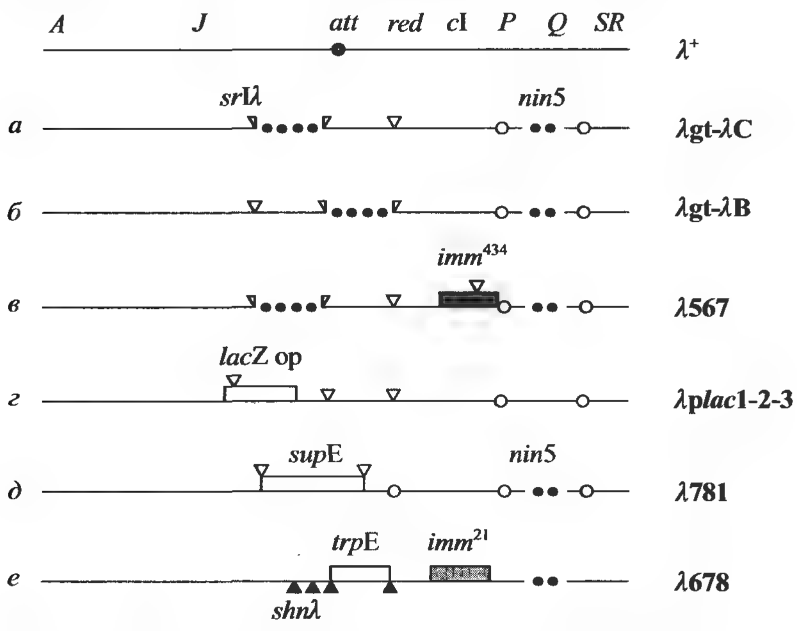


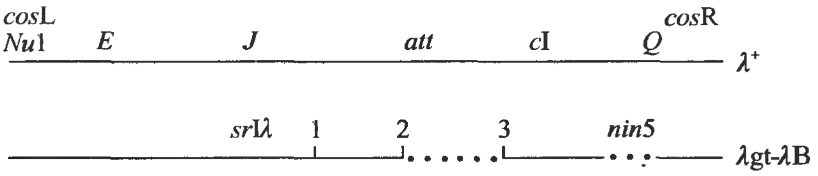
Рис. 2.17. Структура векторов замещения на основе ДНК фага λ. См. обозначения к рис. 2.16

ширить применение полученных ранее векторов. Так, вектор λgt-λB первоначально конструировался для клонирования *Eco*RI-фрагментов ДНК. Современные представления о возможностях использования этого фага в качестве вектора приведены на рис. 2.18.

Ко второму поколению векторов замещения относятся фаги λ, у которых замещаемые фрагменты ДНК с двух сторон ограничены искусственными полилинкерами, содержащими участки узнавания различных рестриктаз (рис. 2.19). Широкое применение получили фаги серии λEMBL. В ряде случаев более удобен фаг λCh40, который имеет в полилинкерах участки узнавания 16 различных рестриктаз. Замещаемый в геноме этого фага фрагмент состоит из 80 копий участка длиной 235 пн, являющегося 5′-концевой частью гена *lacZ* и имеющего сайты узнавания рестриктаз *Nae*I и *Xma*III. Фаг λCh40 на соответствующих штаммах *E. coli* обусловливает α-комплементацию β-галактозидазы (см. 2.2.6) и поэтому на среде с Xgal дает синее окрашивание бляшек. Гибридные фаги, полученные на основе данного вектора, формируют бесцветные бляшки.

В составе векторов, представленных на рис. 2.19, можно клонировать фрагменты ДНК размером до 23 тпн, что обусловило их использование при создании так называемых ***библиотек генов***, или клонотек (геномных библиотек). Для формирования библиотеки генов какого-либо организма в векторные ДНК встраивают полученные случайным образом крупные фрагменты изучаемого генома. Расщепление препарата высокомолекулярной ДНК на большие взаимно перекрывающиеся фрагменты осуществляют чаще всего путем частичного гидролиза мелкощепящей рестриктазой (обычно *Sau*3AI или *Mbo*I). Фрагментация также возможна с помощью физических методов. Для избавления от неспецифического фона (встройка в вектор двух или более несоседних на геноме фрагментов) гидролизат ДНК подвергают фракционированию по размеру и в реакцию лигирования вводят фрагменты протяженностью 15–20 тпн, с тем чтобы в векторную ДНК фага λ мог встроиться только один фрагмент. При встройке двух и более фрагментов размер гибридной ДНК будет превышать предельно допустимый. Важным свойством этой экспериментальной системы является то, что при упаковке в капсид *in vitro* происходит отбор гибридных молекул фаговой ДНК определенного размера (от 38 до 51 тпн). Другой подход предполагает дефосфорилирование фрагментированной геномной ДНК с концов с помощью фосфатазы. Такие фрагменты не способны лигироваться между собой, но встраиваются в векторную ДНК, имеющую нормальные фосфорилированные 5′-концы. В этом случае нет необходимости во фракционировании препарата клонируемой ДНК по размерам.

При создании библиотеки генов определенного организма важно, чтобы каждый сегмент изучаемого генома был представлен среди гибридных молекул ДНК. Необходимое количество клонов в библиотеке определяется соотно-



Рестриктаза	Размер вставки, тпн		Тип вектора
	максимальный	минимальный	
*Eco*RI	15,1 *Eco*RI	2,1 *Eco*RI	Замещения
*Sal*I		10,8 *Sal*I; 0 *Sal*I	То же
*Sst*I	11,4 *Sst*I; 0 *Sst*I		—»—
*Xba*I	10,3 *Xba*I; 0 *Xba*I		Внедрения
*Xho*I		10,3 *Xho*I; 0 *Xho*I	То же
*Eco*RI/*Sal*I	16,7 *Eco*RI	3,4 *Sal*I	Замещения
*Eco*RI/*Xho*I	16,9 *Eco*RI	3,9 *Xho*I	То же
*Sst*I/*Sal*I	13,5 *Sst*I	0,6 *Sal*I	—»—
*Xba*I/*Sal*I	14,1 *Xba*I	1,1 *Sal*I	—»—
*Sal*I/*Xho*I		11,0 *Sal*I; 0 *Xho*I	—»—
*Xba*I/*Sst*I	11,6 *Xba*I; 0 *Sst*I		—»—
*Sst*I/*Xho*I	13,7 *Sst*I	0,8 *Xho*I	—»—
*Xba*I/*Xho*I	14,3 *Xba*I	1,4 *Xho*I	—»—

Рис. 2.18. Варианты использования векторного фага λgt-λB для клонирования фрагментов ДНК

шением размера генома и среднего размера вставок по формуле

$$N = \ln(1 - p)/\ln(1 - x/y),$$

где N — число клонов; x — средний размер вставки; y — размер гаплоидного генома; p — вероятность того, что любая последовательность представлена в библиотеке генов хотя бы один раз.

Выбрав $p = 0{,}99$ и зная средний размер вставок, можно рассчитать необходимый объем библиотек для разных геномов (табл. 2.1). Библиотеки такого объема называют представительными. Их можно использовать для процедуры, получившей название «***прогулка по хромосоме***». Суть этого подхода состоит в том, что при помощи гибридизации нуклеиновых кислот выявляют клоны гибридов, вставки у кото-

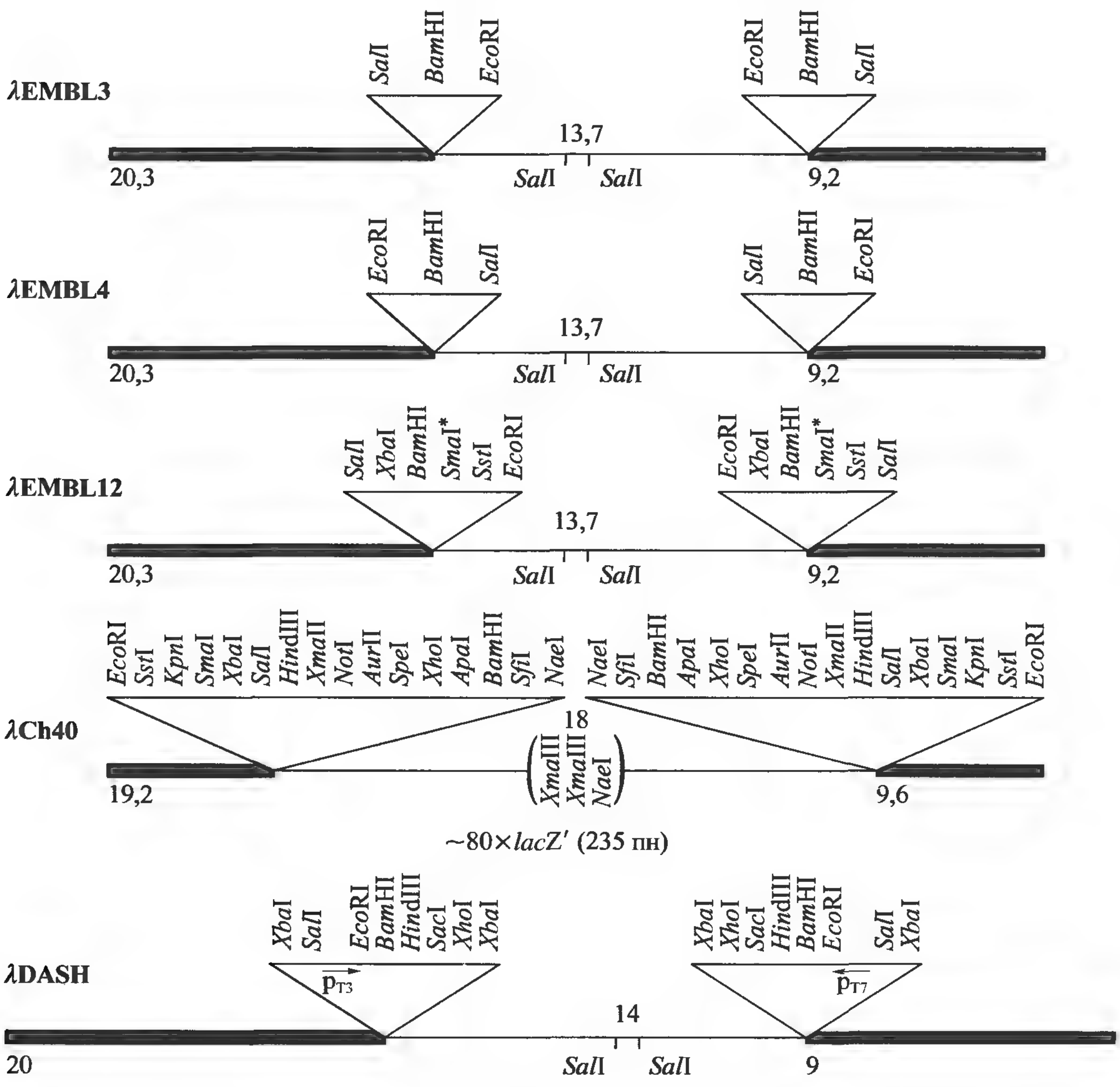


Рис. 2.19. Физические карты генома векторных фагов λ, предназначенных для клонирования крупных фрагментов ДНК.

Толстые линии — векторная часть фаговой ДНК; цифрами указан размер фрагментов фагового генома в тпн. Рестриктаза *Sma*I (помечена звездочкой) имеет участки узнавания и в векторной части фаговой ДНК

рых частично перекрывают друг друга по последовательности, т. е. являются «соседями» на изучаемой хромосоме. Последовательно выявляя «соседей», клоны гибридов можно идентифицировать и расположить в таком порядке, чтобы их вставки в целом последовательно покрывали весь геном. Такой набор клонов называют ***энциклопедией генов***. Удобными для «прогулки по хромосоме» являются векторы типа λDASH (см. рис. 2.19). Они содержат промоторы фагов T7 и T3, прилегающие к чужеродной ДНК в составе гибрида. С помощью соответствующих фаговых РНК-полимераз можно считывать *in vitro* радиоактивно меченные транскрипты, комплементарные концам встройки. Гибридизуя полученный препарат РНК с ДНК других гибридных клонов, достаточно просто устанавливают «соседей».

Перевод представительной библиотеки в энциклопедию генов хотя и трудоемок, но дает в последующем целый ряд преимуществ. Во-первых, работая с энциклопедией, можно определить физическое положение определенного гена в геноме. Во-вторых, число клонов гибридных ДНК в энциклопедии гораздо меньше, чем в библиотеке, и это упрощает работу по выявлению и изучению отдельных локусов. Например, для создания полной энциклопедии генов *E. coli* исследователям пришлось проанализировать 3400 клонов гибридов, а сформированная энциклопедия содержит лишь 381 клон.

Хотя векторы замещения на основе ДНК фага λ успешно используются при создании биб-

Таблица 2.1. **Объем представительных библиотек генов некоторых организмов при клонировании фрагментов ДНК в составе ДНК фага λ или космид ($p < 0,99$)**

Организм	Размер гаплоидного генома, тпн	Число клонов для вставки длиной (тпн)	
		20	45
Бактерия (*Escherichia coli*)	$4,6 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	$4,7 \cdot 10^2$
Дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*)	$1,2 \cdot 10^4$	$2,8 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^3$
Насекомое (*Drosophila melanogaster*)	$1,8 \cdot 10^5$	$4,1 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^4$
Человек (*Homo sapiens*)	$3,0 \cdot 10^6$	$6,9 \cdot 10^5$	$3,1 \cdot 10^5$

лиотек генов, они имеют определенные недостатки, главным из которых является ограничение размера клонируемых фрагментов величиной 24 тпн. Известно, что ряд эукариотических генов в силу их экзон-интронной (раздробленной) структуры имеют очень большие размеры. Например, ген дигидрофолатредуктазы мыши состоит из 32 тпн, а ген коллагена α2 цыпленка имеет размер 38 тпн. Для клонирования таких крупных фрагментов ДНК Дж. Коллинз и Б. Хон в 1978 г. создали специальные векторные молекулы — космиды.

2.2.3. Космиды

Космиды — это плазмидные векторы, в которые встроен участок генома фага λ, обеспечивающий возможность упаковки этой молекулы ДНК в фаговую частицу. Необходимыми компонентами космидного клонирующего вектора являются:

- плазмидный участок начала репликации ДНК и детерминанта устойчивости к антибиотику;
- единичное число мест гидролиза одной или несколькими рестриктазами, пригодных для клонирования фрагментов ДНК;
- фрагмент ДНК, содержащий ковалентно зашитые липкие концы фага λ (*cos*-сайт).

Кроме того, космида должна иметь небольшой размер, чтобы можно было клонировать фрагменты ДНК длиной более 30 тпн.

Принцип клонирования в космидах, предложенный Дж. Коллинзом и Б. Хоном (1978 г.), приведен на рис. 2.20. Лигированию подвергается смесь молекул космидной и клонируемой ДНК, гидролизованных определенной рестриктазой. При этом космида находится в высокой концентрации. Среди большого многообразия продуктов лигазной реакции образуются также молекулы, состоящие из клонируемых фрагментов ДНК, к обоим концам которых пришиты космиды так, что оба *cos*-сайта находятся в одинаковой ориентации и между этими *cos*-сайтами сосредоточена вся генетическая информация космиды.

Когда такие молекулы инкубируют в реакции упаковки ДНК фага λ *in vitro*, *cos*-сайты, фланкирующие чужеродную ДНК, расщепляются фаговыми ферментами с образованием одноцепочечных липких концов, и получившиеся молекулы ДНК упаковываются в фаговые капсиды. После инфекции клеток *E. coli* образовавшимися *in vitro* фаговыми частицами гибридные ДНК внедряются в клетки, циклизуются по липким фаговым концам, реплицируются как плазмиды и детерминируют устойчивость к определенному антибиотику. В процессе упаковки гибридных ДНК *in vitro* происходит отбор гибридов, суммарный размер ДНК которых составляет 38–51 тпн. Наиболее популярные космидные векторы имеют размер 4–6 тпн, поэтому в них можно клонировать фрагменты ДНК длиной от 35 до 45 тпн.

Космидные библиотеки генов состоят из меньшего числа клонов, чем библиотеки на основе векторных фагов λ (см. табл. 2.1). Однако последние все же предпочтительнее в тех случаях, когда не требуются фрагменты размером более 20 тпн. Это связано с некоторыми техническими сложностями, возникающими при конструировании библиотек генов на основе космид. Так, оказалось, что при этом происходит лигирование векторов друг с другом (см. рис. 2.20), что дает высокий фон клонов, не содержащих вставок чужеродной ДНК. Кроме того, скрининг большого числа колоний бактерий проводить сложнее, чем фаговых бляшек. Клонированные крупные фрагменты в составе ДНК фага более стабильны, чем в космидах, поскольку репликон фага адаптирован к поддержанию молекул большого размера. Важно отметить, что для предотвращения встройки в космидный вектор нескольких несоседних на геноме фрагментов необходимо проводить фракционирование клонируемой ДНК или дефосфорилирование, как и в случае получения библиотек генов на основе фага λ.

Д. Иш-Горовиц и Дж. Бюрк в 1981 г. предложили другую схему клонирования в космидах (рис. 2.21), которая позволяет преодолеть неко-

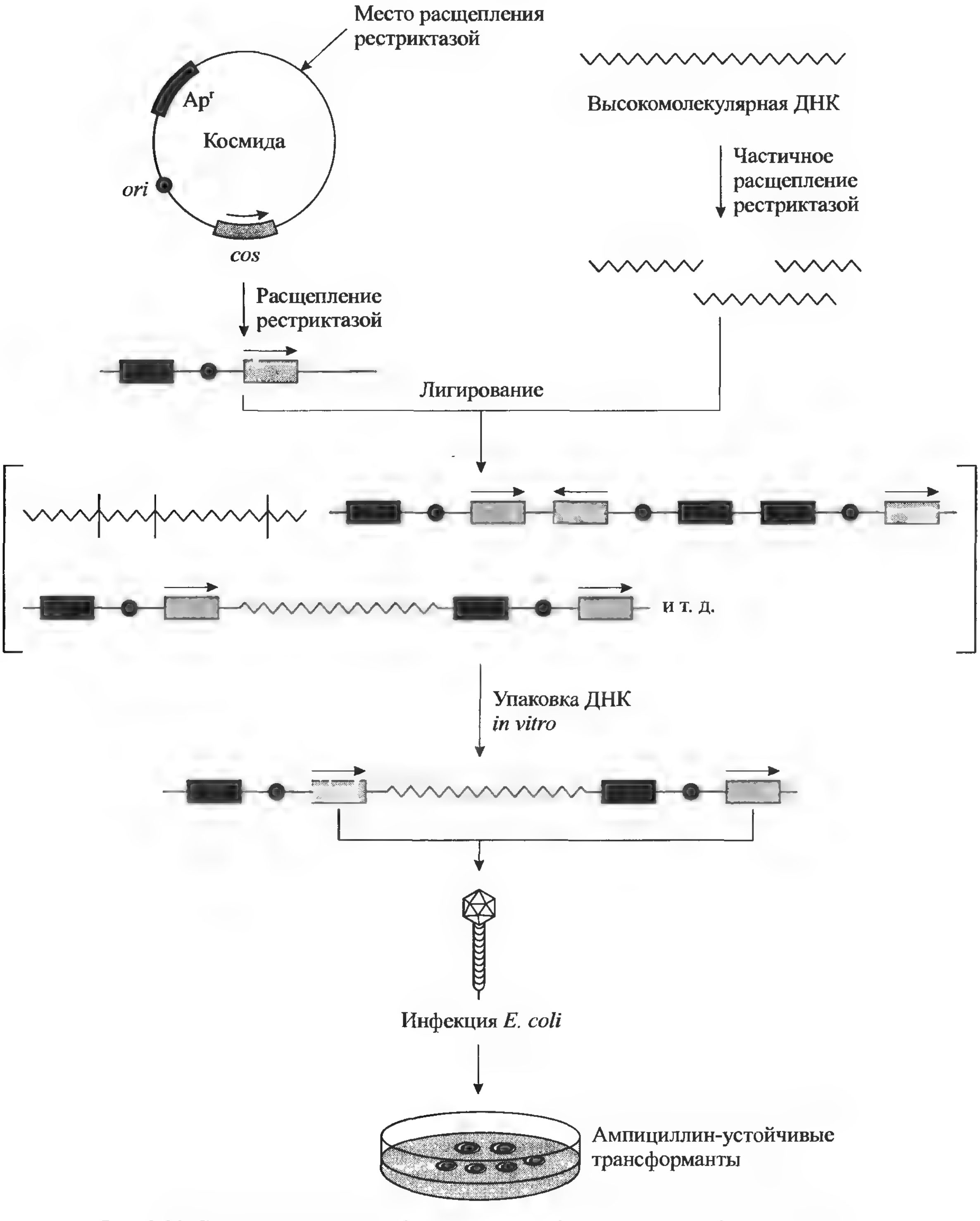


Рис. 2.20. Схема клонирования фрагментов ДНК в космидах по Коллинзу и Хону

торые из отмеченных выше трудностей. Препарат космидного вектора разделяют на две порции, каждую из которых расщепляют определенной рестриктазой. Первый фермент делает разрыв с одной стороны от последовательности *cos*, а второй — с другой стороны. Полученные линейные формы космиды дефосфорилируют, что в дальнейшем предотвращает олигомеризацию вектора. После этого оба препарата космиды гидролизуют рестриктазой *Bam*HI, смешивают с дефосфорилированными продуктами неполного гидролиза клонируемой ДНК рестриктазами *Sau*3AI или *Mbo*I. При такой процедуре получается лишь один тип молекул ДНК, способных упаковываться в капсиды фага λ.

В 1983 г. П. Бейтс и Р. Свифт сконструировали новый тип космид, которые позволяют еще больше упростить процедуру получения космидных библиотек. Такие космиды содержат по два *cos*-участка, разделенных последова-

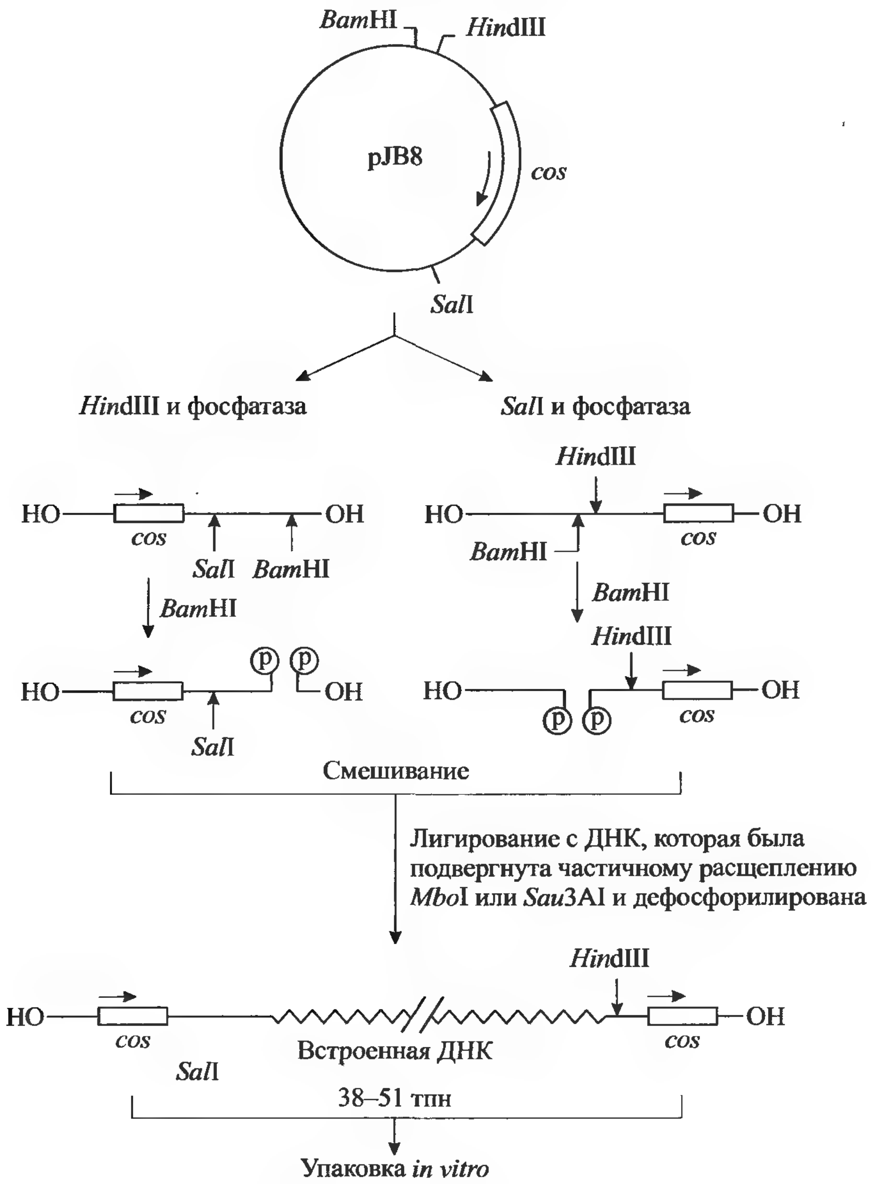


Рис. 2.21. Схема клонирования фрагментов ДНК в космидах по Иш-Горовицу и Бюрку

тельностью, в которой находится сайт узнавания рестриктазы, образующей при гидролизе ДНК тупые концы. Схема этого подхода приведена на рис. 2.22. Космиду c2XB обрабатывают рестриктазами *Bam*HI и *Sma*I (дает тупой конец), затем добавляют препарат клонируемой ДНК, подвергнутый частичному гидролизу *Sau*3AI или *Mbo*I и дефосфорилированный. Лигазную реакцию проводят при повышенной концентрации ATP (условия, при которых не происходит лигирование фрагментов по тупым концам).

В настоящее время получен широкий спектр разнообразных космид, которые используют при создании библиотек генов прокариотических и эукариотических организмов. Вводя в состав космид полилинкеры, можно существенно расширять возможности этих векторов по клонированию чужеродных фрагментов. Так, космида pJRD215 содержит участки расщепления для 16 рестриктаз. В целом можно заключить, что векторные фаги λ и космиды составляют взаимодополняющую группу векторов, пригодных для формирования библиотек и энциклопедий генов.

2.2.4. Искусственные бактериальные хромосомы

В 1992 г. Х. Шизуя с соавторами описали новую бактериальную векторную систему, позволяющую клонировать фрагменты чужеродной ДНК размером до 300 тпн. Эта система названа BAC (от англ. bacterial artificial chromosome — бактериальная искусственная хромосома). Она основана на использовании хорошо изученного полового фактора F *E. coli*. Реплика-

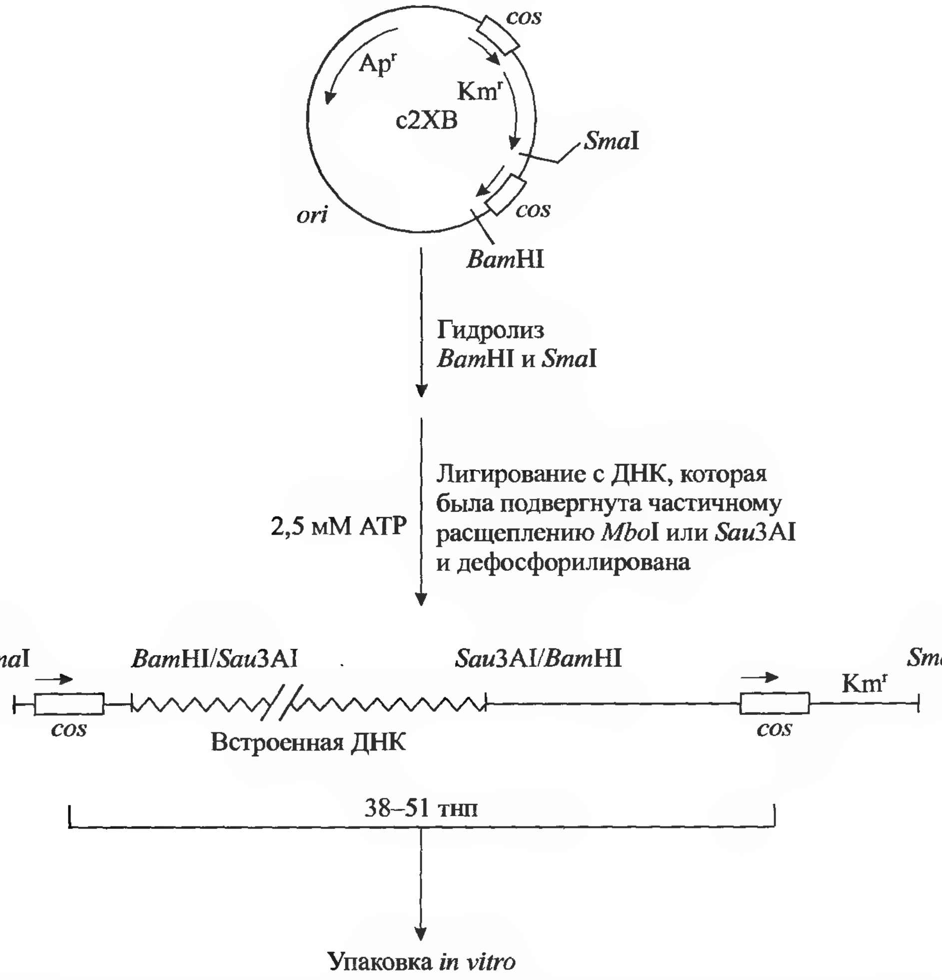


Рис. 2.22. Схема клонирования фрагментов ДНК в космидах по Бейтсу и Свифту

ция фактора F в бактериальных клетках строго контролируется, и его копийность составляет 1–2 молекулы на клетку.

Многие бактериальные молекулярные векторы основаны на высоко- или среднекопийных репликонах, которым часто свойственна структурная нестабильность встроенных фрагментов (см. гл. 8), сопровождаемая делетированием или перестройкой сегментов клонированных фрагментов ДНК. Особенно такая нестабильность характерна для протяженных фрагментов ДНК эукариотических организмов, поскольку они могут содержать различные семейства повторяющихся последовательностей.

Фактор F кодирует гены, не только регулирующие его репликацию, но и контролирующие копийность. Регуляторные генетические локусы включают *ori*S, *rep*E, *par*A и *par*B (о *par*-генах см. дополнительно гл. 8). Продукт гена *rep*E обусловливает однонаправленную репликацию фактора F с района *ori*S, а продукты генов *par*A и *par*B обеспечивают правильное распределение фактора F между делящимися клетками и поддерживают его копийность на уровне 1–2 молекул.

Вектор ВАС (рВАС) был создан на основе мини-F плазмиды pMBO131, в которую по участку *Sal*I встроили фрагмент ДНК, содержащий участки *cos* фага λ и *lox*P фага P1. Кроме того, встроенный фрагмент содержал уникальные участки гидролиза рестриктазами *Bam*HI и *Hin*dIII, предназначенные для клонирования фрагментов ДНК, промоторы фагов T7 и Sp6 для синтеза *in vitro* радиоактивно или флуоресцентно меченных РНК-транскриптов в качестве гибридизационных проб для «прогулки по хромосоме» и участки редкощепящих рестриктаз, узнающих восьминуклеотидные последовательности (рис. 2.23).

По участку *lox*P плазмидная ДНК может быть расщеплена белком Cre фага P1, по *cos*-участку — соответствующим ферментом фага λ. Такие участки удобны для строго специфичного расщепления гибридных плазмид, мечения полученных концов и последующего рестрикционного картирования клонированных фрагментов изучаемого генома.

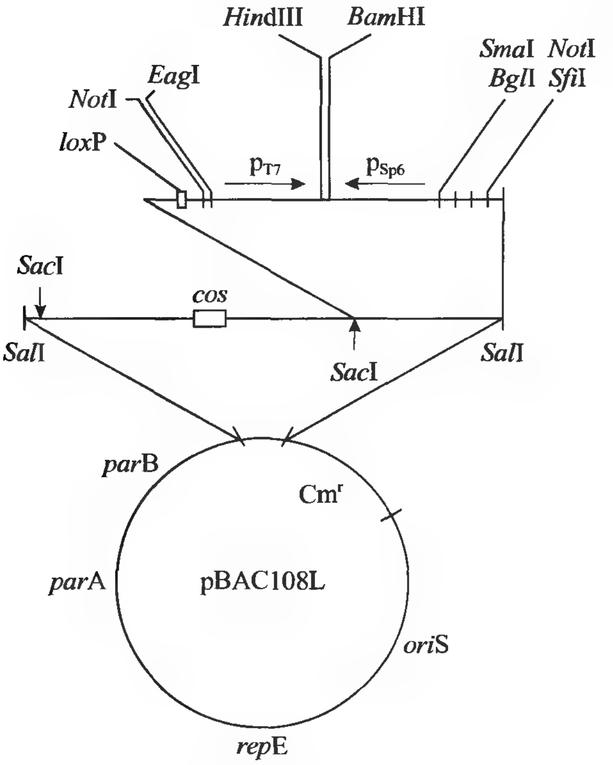


Рис. 2.23. Карта векторной плазмиды pBAC108L

Хромосомную ДНК человека Х. Шизуя с соавторами частично гидролизовали рестриктазой *Hind*III и фракционировали в геле легкоплавкой агарозы пульс-электрофорезом. Выделяли фрагменты размером 100–300 тпн, которые лигировали с расщепленной *Hind*III и дефосфорилированной ДНК плазмиды pBAC108L. Полученный материал вводили в клетки *E. coli* электропорацией и отбирали клоны трансформантов по устойчивости к хлорамфениколу. После гидролиза клонов рестриктазой *Not*I и пульс-электрофореза был определен размер встроенных фрагментов человеческой ДНК, который составил 125–300 тпн. Пассирование отобранных клонов бактерий продемонстрировало высокую стабильность встроек в ВАС-векторе.

Дальнейшие исследования показали, что структурная стабильность протяженных встроек в ВАС-системе существенно выше, чем в YAC-системе, также используемой для клонирования очень больших фрагментов ДНК (см. 12.4.4). ВАС-система используется для создания библиотек фрагментов сложных геномов, в частности, она сыграла важную роль в картировании и секвенировании генома человека.

2.2.5. Фазмиды

При выполнении определенного типа экспериментов по созданию и изучению геномных клонотек удобно использовать фазмиды — молекулярные векторы, являющиеся искусственными гибридами между фагом и плазмидой. Фазмиды после встройки чужеродной ДНК могут в одних условиях развиваться как фаги, а в других как плазмиды.

Рассмотрим основные свойства фазмид на примере вектора λpMYF131 (рис. 2.24), описанного в 1987 г. Н. К. Янковским с соавторами. Данная фазмида содержит участки узнавания разных рестриктаз, пригодные для клонирования фрагментов ДНК. Она имеет размер 33 277 пн, что составляет 68 % от величины ДНК фага λ дикого типа. Хотя фазмида λpMYF131 содержит все гены и участки, необходимые для литического развития фага λ, она не способна образовывать негативные колонии, так как столь малая ДНК не упаковывается в капсиды. Фазмида поддерживается в клетках *E. coli* в форме плазмиды. Увеличение размера при встраивании фрагмента чужеродной ДНК *in vitro* придает ей свойства недефектного фага.

Максимальный размер фрагментов ДНК, которые можно клонировать в фазмидах, обычно несколько меньше допустимой величины встройки для векторов на основе ДНК фага λ (этот размер легко высчитать, зная величину вектора; см. 2.2.2). Фазмиду выделяют из клеток в виде плазмиды, гидролизуют определенной рестриктазой и лигируют с продуктами неполного гидролиза изучаемой ДНК, после чего проводят упаковку ДНК в капсиды фага λ.

Фазмиды имеют важные преимущества перед векторами других типов, используемыми для создания библиотек генов. В отличие от векторов замещения фага λ нет необходимости отделять векторную молекулу ДНК от внутреннего балластного фрагмента, что существенно упрощает процедуру подготовки вектора к встройке чужеродной ДНК. Более того, это

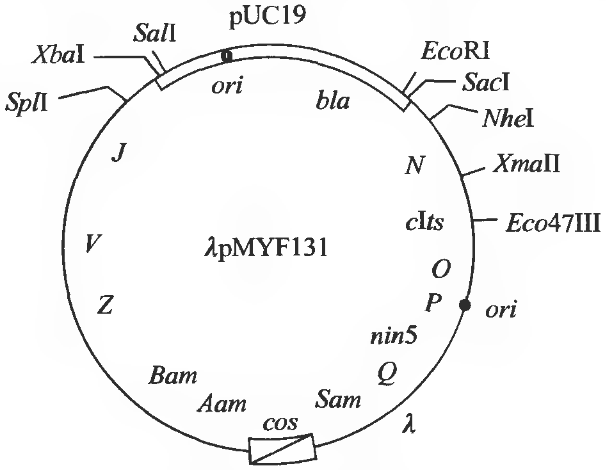


Рис. 2.24. Карта фазмиды λpMYF131

обеспечивает практически полное отсутствие у фазмиды «фоновых» гибридов, которые обычно образуются у фаговых векторов, так как очень сложно полностью избавиться от замещаемого внутреннего фрагмента. В отличие от космид фазмида типа λpMYF131 после лигазной обработки не способна упаковывать в фаговые частицы свои димерные и тем более мультимерные формы, поскольку даже димер превышает по размеру фаговую ДНК, способную к упаковке. Поэтому при использовании фазмидного вектора не требуются дополнительные ферментные обработки, которые обычно необходимы для космид.

Таким образом, применение фазмидных векторов упрощает процедуру получения и отбора гибридных молекул ДНК, так как только гибридные фазмиды могут образовывать на бактериальном газоне фаговые бляшки. В отличие от космидной или фаговой векторных систем фазмидный вектор существует в клетке в виде плазмиды, а клонотека получается и хранится в виде суспензии гибридных фагов.

Если гибридными фазмидами инфицировать клетки *E. coli*, лизогенные по фагу λ (т. е. содержащие в большом количестве белок-репрессор cI фага), то фаговые гены экспрессироваться не будут, а гибридные кольцевые молекулы ДНК будут размножаться за счет репликона плазмиды. При этом будет синтезироваться продукт гена устойчивости к антибиотику, кодируемый плазмидой. Клетки *E. coli*(λ), инфицированные гибридными фазмидами, на среде с соответствующим антибиотиком (ампициллином для λpMYF131) будут формировать бактериальные колонии. Содержащиеся в фазмиде чужеродные гены в этих условиях не репрессируются, что позволяет успешно использовать такие гибриды в комплементационном анализе. Если необходимо получить фазмиду снова в фаговой форме, то осуществляют индукцию ее литического развития (наиболее простой способ для λpMYF131 — термоиндукция). Таким образом, фазмиды являются векторами, обеспечивающими возможность смены фаз, т. е. экспериментально регулируемого переключения развития гибридных ДНК на фаговый или плазмидный путь.

2.2.6. Клонирующие векторы на основе нитевидных фагов

При клонировании и амплификации в векторных плазмидах или производных фага λ чужеродные фрагменты ДНК находятся в двухцепочечной форме. Однако в ряде случаев, например, при гетеродуплексном анализе, определении последовательности нуклеотидов, выделении комплементарной РНК, направленном мутагенезе и некоторых других, необходимо манипулировать с одной цепью ДНК. При этом приходится разделять цепи ДНК, что не всегда можно сделать достаточно просто. Поэтому клонирование ДНК в одноцепочечных векторах является привлекательным объединением процедур изолирования целевой последовательности ДНК, ее амплификации и разделения цепей исходно двухцепочечного фрагмента ДНК.

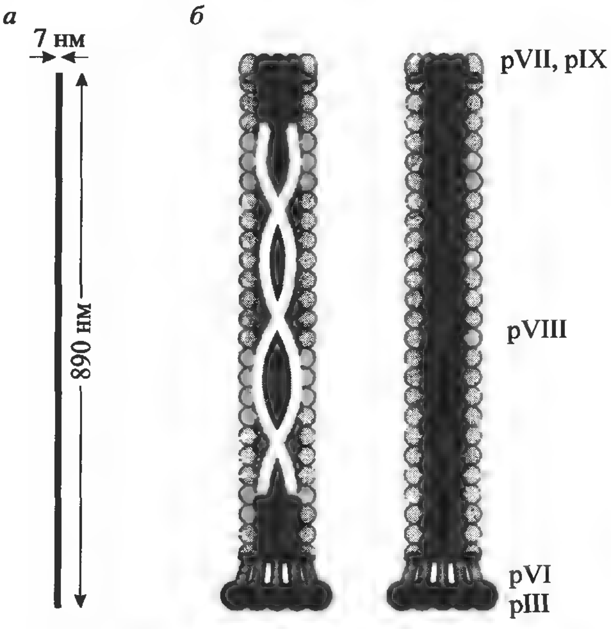


Рис. 2.25. Схема частицы нитевидного фага:

а — соотношение размеров частицы;
б — схема упаковки белков оболочки (внутри изображена цепь ДНК)

Нитевидные фаги *E. coli* (M13, fd, f1) наиболее подходят для этой цели. Длинные (900 нм), тонкие (7 нм) и гибкие вирионы этих фагов представляют собой кольцевую одноцепочечную ДНК (оцДНК) длиной 6407 нуклеотидов для фага M13 и 6408 нуклеотидов для фагов fd и f1. ДНК упакована в трубочку, состоящую из 2700 копий основного оболочечного белка pVIII и закрытую на концах четырьмя или пятью молекулами каждого из четырех минорных оболочечных белков pIII, pVI, pVII и pIX (рис. 2.25).

Нитевидные фаги адсорбируются на F-пилях *E. coli* и поэтому способны инфицировать лишь мужские (F^+) бактериальные клетки. Инфекция клеток *E. coli* начинается после адсорбции белка pIII, входящего в состав фаговых частиц, на конце F-пили хозяйской клетки. После этого оцДНК фага, называемая (+)-цепью, пере-

носится в цитоплазму клетки. Бактериальные полимеразы осуществляют синтез второй, (–)-цепи, образуя двухцепочечную ***репликативную форму*** (РФ) фагового генома. Синтез второй цепи инициируется на *ori*(–), расположенном в межгенной области IR (рис. 2.26). На молекулах РФ осуществляется транскрипция и последующая трансляция фаговых генов. Белок pII вносит разрыв в (+)-цепь РФ в участке *ori*(+), также расположенном в межгенной области IR. Это приводит к репликации фаговой ДНК по модели катящегося кольца с высвобождением (+)-цепи. По завершении цикла белок pII лигирует концы образовавшейся одноцепочечной (+) ДНК. На ранних этапах инфекции новые (+)-цепи служат в качестве матриц для образования дополнительных молекул РФ, однако по мере накопления фагового белка pV, связывающего оцДНК, процесс формирования РФ тормозится. Копийность РФ составляет 200–300 молекул на клетку.

Для сборки вирионов и их экспорта необходимы клеточные мембраны. Новосинтезированные оболочечные белки фага встраиваются в плазматическую мембрану. Белки pIII и pVIII синтезируются с N-концевыми сигнальными пептидами (см. 2.2.10), которые отщепляются после секреции через плазматическую мембрану. С-концевые гидрофобные домены белков остаются в мембране, а N-концевые части выходят в периплазматическое пространство. Белки pI и pIV образуют мультимерный экспортный канал между внутренней и внешней мембранами. Инициация сборки и экспорта вириона происходит после взаимодействия специфической нуклеотидной последовательности (так называемый сигнал упаковки) в IR-области (+)ДНК с комплексом pI–pIV, бактериальным тиоредоксином и минорными оболочечными белками pVII и pIX. Образуемые вирионы экскретируются через экспортный канал, при этом молекулы белка pV на ДНК постепенно замещаются молекулами белка pVIII. Присоединение белков pVI и pIII к концу формируемых вирионов завершает процесс их сборки.

Длина вирионов зависит от величины фагового генома и может варьировать в широких пределах. Длина частиц гибридного фага увеличивается пропорционально размеру пакующейся ДНК. Образующиеся при инфекции фаговые частицы постоянно экскретируются клетками без лизиса последних, и этот процесс является энергозависимым. За одну генерацию образуется несколько сотен фагов на клетку.

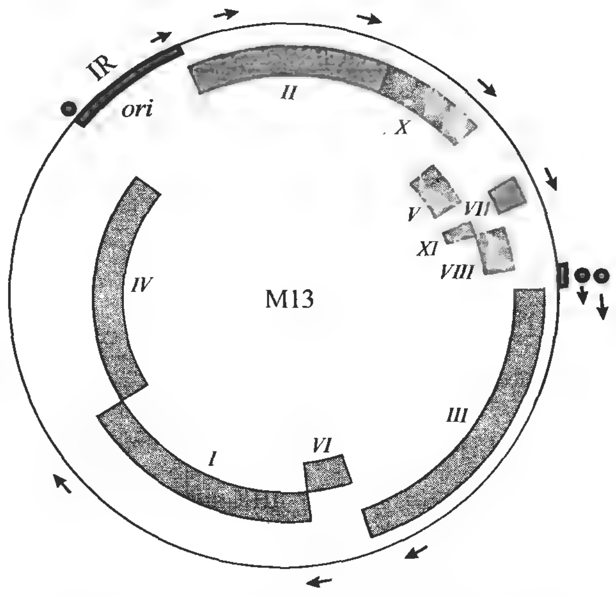


Рис. 2.26. Генетическая организация нитевидного фага M13.

Гены обозначены серыми блоками и римскими цифрами, межгенные области — черными блоками. Стрелками показаны промоторы и направление транскрипции, черными кружками — терминаторы транскрипции

Скорость роста зараженных клеток на 25–50 % ниже, чем неинфицированных. Поэтому при титровании нитевидные фаги образуют на бактериальном газоне мутные бляшки. При размножении нитевидных фагов в бактериальной клетке их геном одновременно присутствует в виде большого числа копий двухцепочечной кольцевой плазмиды и одноцепочечной ДНК в составе вирионов. Из одного литра инфицированной культуры получают несколько миллиграммов одноцепочечной и репликативной двухцепочечной форм фаговой ДНК. На одноцепочечной вирионной ДНК многие манипуляции по созданию гибридных молекул, разработанные для вирусных и плазмидных двухцепочечных ДНК, реализовать нельзя. Однако они с успехом применимы к репликативной форме генома нитевидных фагов, которая инфекционна в тесте трансфекции клеток *E. coli*. Все это обусловило использование нитевидных фагов для создания клонирующих векторов.

Наличие несущественной области в фаговом геноме является важным условием для конструирования гибридов. Однако у нитевидных фагов большинство амбер-мутаций приводит к гибели фага при непермиссивных условиях. В геноме этих фагов существует лишь межгенная область IR размером 500 нуклеотидов, во многие места которой могут быть внесены изменения без нарушения жизнеспособности фага. Репликативная форма фаговой ДНК не имеет

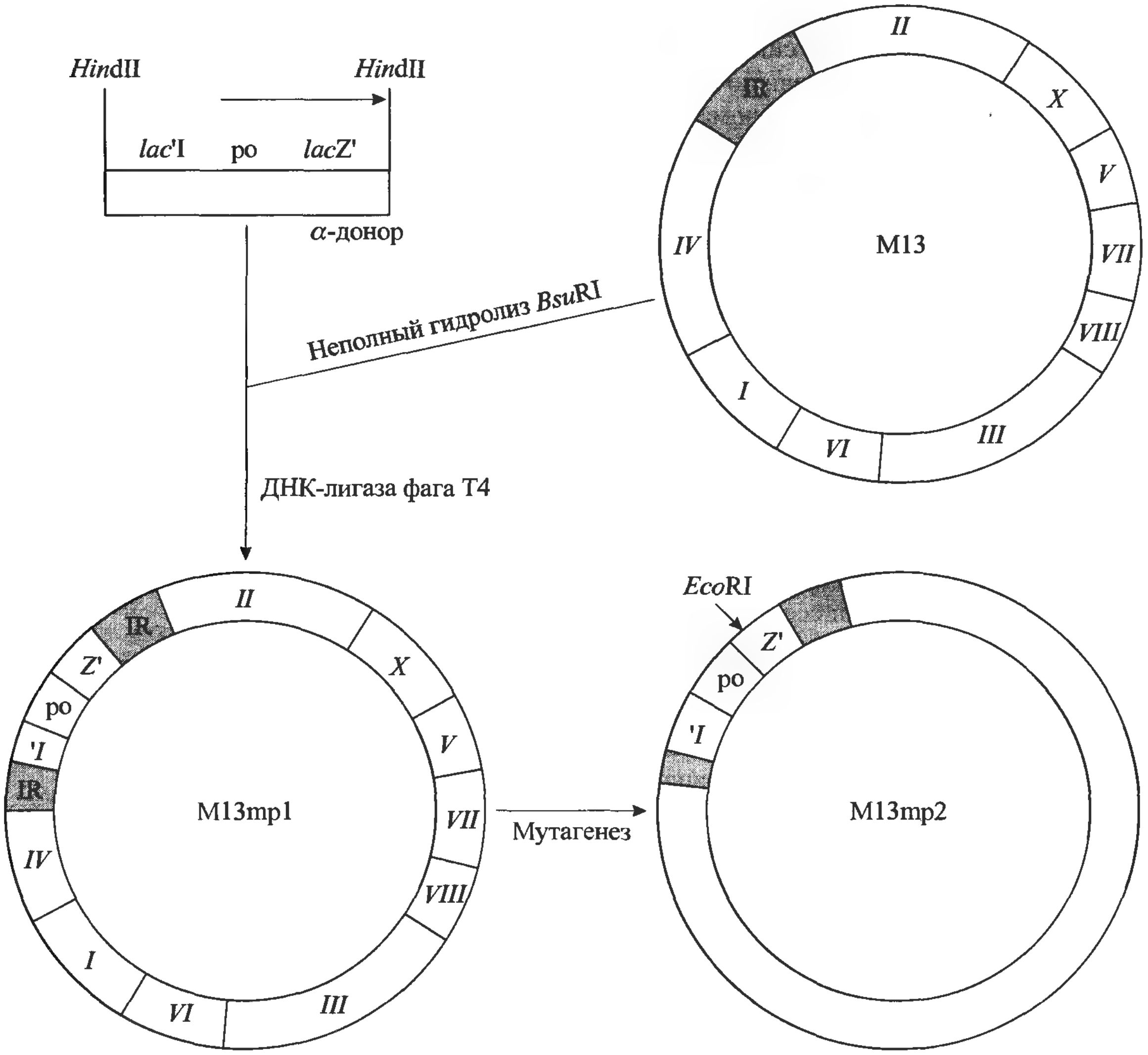


Рис. 2.27. Схема создания гибридных фагов M13.
IR — межгенная область; римскими цифрами обозначены гены фага

участков узнавания многих крупнощепящих рестриктаз, образующих при гидролизе липкие концы. Кроме того, фаговый геном не содержит генетических маркеров, которые позволили бы выявлять гибридные фаги. Поэтому конструирование векторных нитевидных фагов включает в себя прежде всего введение в геном селективных маркеров и уникальных мест действия определенных рестриктаз.

Первый гибридный фаг M13 был описан Дж. Мессингом с соавторами в 1977 г. Репликативная форма ДНК фага M13 гидролизуется рестриктазой *Bsu*RI на 10 фрагментов, имеющих тупые концы. Чтобы получить полный фаговый геном в линейной форме, РФ гидролизовали ограниченным количеством рестриктазы *Bsu*RI так, что каждая молекула ДНК расщеплялась лишь в одном месте. Линейные молекулы размером в полный фаговый геном выделили электрофоретически и к ним добавили *Hin*dII-фрагмент лактозного оперона *E. coli*, имеющий размер 789 пн и содержащий часть гена *lac*I, промоторно-операторную область и начальную часть гена *lac*Z, кодирующую 145 N-концевых аминокислот β-галактозидазы (рис. 2.27). Полученные фрагменты сшили по тупым концам с помощью ДНК-лигазы фага Т4 и провели трансфекцию клеток *E. coli*. Для понимания принципа отбора гибридных фагов рассмотрим строение лактозного оперона *E. coli*.

Лактозный оперон (lac-оперон) E. coli состоит из трех генов, с которых транскрибируется единая полицистронная мРНК (рис. 2.28). Ген *lac*Z является структурным геном β-галактозидазы, катализирующей расщепление лактозы на глюкозу и галактозу. Ген *lac*Y — структурный ген пермеазы, необходимой для транспорта лактозы в клетку. Ген *lac*A кодирует тиогалактозидтрансацетилазу. Синтез мРНК *lac*-оперона регулируется белком, называемым реп-

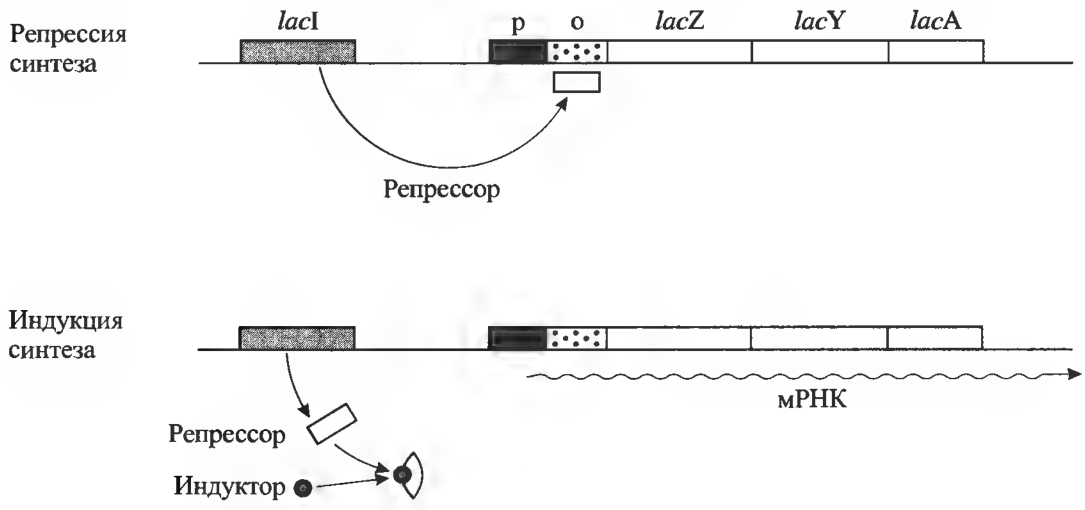


Рис. 2.28. Схема *lac*-оперона *E. coli*.

p — промотор; o — оператор

рессором. Этот белок кодируется геном *lac*I. В активной форме репрессор связывается на ДНК с операторным участком (o) *lac*-оперона и блокирует транскрипцию мРНК с промотора p_{lac}. Блокированный таким образом оперон называют репрессированным. При инактивации репрессора (в результате мутации или связывания с определенными небольшими молекулами) он теряет способность образовывать комплекс с оператором. Те производные лактозы, которые связываются с репрессором и изменяют его способность к взаимодействию с ДНК, называются индукторами. К таким соединениям относится, например, синтетический аналог лактозы изопропилтиогалактозид (ИПТГ), который не метаболизируется клетками и поэтому широко используется в качестве индуктора.

Клетки с мутацией по гену *lac*I, ведущей к образованию дефектных молекул репрессора, осуществляют конститутивную (нерегулируемую) транскрипцию *lac*-оперона. Мутанты *lac*I^Q характеризуются сверхсинтезом белка-репрессора. Присутствие больших количеств *lac*-репрессора препятствует полной экспрессии генов *lac*-оперона даже при наличии индуктора ИПТГ. Использование клетки-хозяина с мутацией *lac*I^Q позволяет эффективно регулировать транскрипцию с промотора p_{lac}. В обычных условиях в *E. coli lac*I^Q транскрипция с данного промотора практически не происходит, но в нужный момент она может быть индуцирована добавлением в среду ИПТГ.

Наибольший интерес для молекулярных биологов в *lac*-опероне представляет ген *lac*Z. Продукт этого гена — β-галактозидаза (β-Gal) — легко определяется по специфической ферментативной активности (см. 2.2.2). Более того, данный фермент обладает рядом уникальных свойств. В 1968 г. была описана так называемая α-комплементация β-галактозидазы, которая относится к внутрицистронной (внутригенной) комплементации и состоит в том, что в результате нековалентной ассоциации различных мутантных форм или фрагментов одного и того же белка образуется фуикционально активный белок. Полипептид β-Gal состоит из 1021 аминокислотного остатка. Ферментативной активностью обладает белок, состоящий из четырех идентичных субъединиц (тетрамер с суммарной молекулярной массой 460 кДа). При изучении различных мутантов по гену *lac*Z были выявлены неактивные формы β-галактозидазы, обозначенные M15 и M112 и имеющие соответственно делеции аминокислот с 11-й по 41-ю (Δ11–41 АК) и с 23-й по 31-ю (Δ23–31 АК). Оказалось, что эти мутантные белки не образуют тетрамерной структуры, а являются димерами. Более того, было обнаружено, что если к препарату β-Gal M15 или M112 добавить пептид 3–92 АК, получаемый после гидролиза β-галактозидазы бромистым цианом (гидролизует белки по метиониновым остаткам), то происходит комплементация и ферментативная активность восстанавливается. Такой фермент, подобно нативному, имеет тетрамерную структуру. Неактивные белки с делецией в N-концевой последовательности β-Gal получили название α-акцепторы, а комплементирующие их пептиды или мутантные формы белка — α-доноры. В более поздних исследованиях было показано, что пептид 3–41 АК также является полностью активным α-донором по отношению к β-Gal M15.

Полученный в экспериментах Дж. Мессинга гибридный фаг M13, содержащий встраивае-

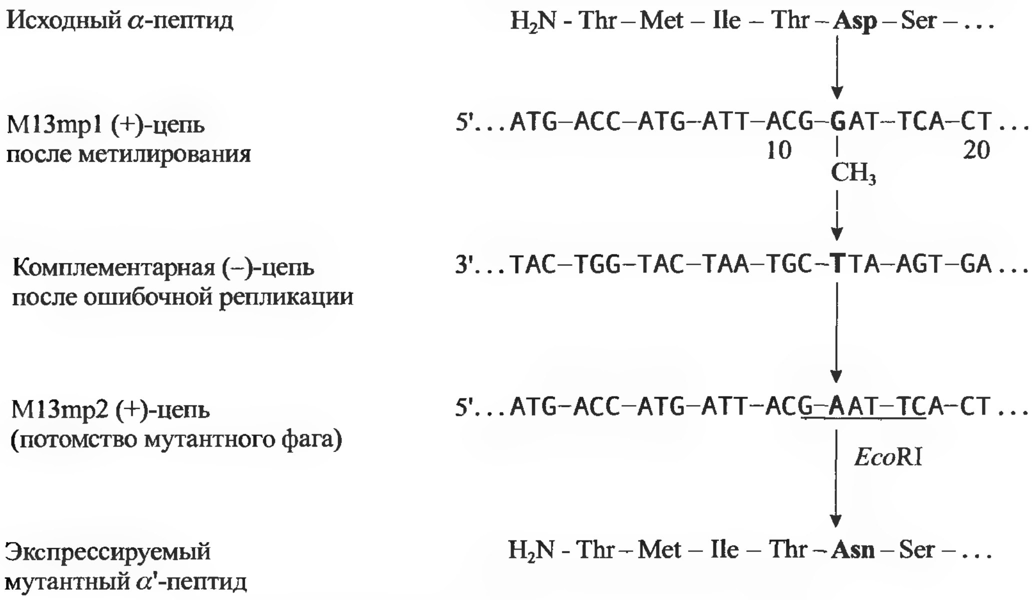


Рис. 2.29. Введение *Eco*RI-участка в ДНК фага M13mp1

мый *Hin*dII-фрагмент лактозного оперона, должен детерминировать в клетках *E. coli* синтез полноценного α-донора (1–145 АК) β-галактозидазы. Наиболее просто выявить такой синтез можно, используя в качестве хозяина мутантный штамм *E. coli*, синтезирующий α-акцептор β-Gal. В этом случае *in vivo* будет происходить α-комплементация и фенотип Lac^- исходных клеток изменится в инфицированных клетках на Lac^+. Такое изменение фенотипа легко тестировать с помощью цитохимической реакции, происходящей в агаризованной среде, содержащей хромогенное соединение Xgal (см. 2.2.2). Газон клеток-реципиентов *E. coli*, синтезирующих α-акцептор β-Gal (обычно используют мутант *lacZ* ΔM15), на среде с Xgal будет белого цвета, а окрашивание в синий цвет должно выявляться только в районах скопления клеток, инфицированных гибридным фагом M13 (бляшках). При этом исходный фаг формирует бесцветные бляшки.

Отобранный на среде с Xgal гибридный фаг, синтезирующий α-донор β-галактозидазы, обозначили M13mp1. Однако этот фаг еще нельзя было использовать в качестве векторного, так как в нем отсутствовали единичные места гидролиза рестриктазами в межгенной области. Поэтому была предпринята попытка сформировать рестрикционный участок, используя мутагены, специфично действующие на одноцепочечную ДНК. Последовательность, узнаваемую рестриктазой *Eco*RI, удалось создать, заменив гуанин в положении 13 структурного гена *lacZ* на аденин. Такую замену осуществили с помощью алкилирующего агента N-метил-N-нитрозомочевины. Метилирование этим мутагеном гуанина по положению O^6 обусловливает при репликации ДНК ошибочное спаривание, приводящее к замене в фаговом потомстве модифицированного гуанина на аденин (рис. 2.29).

После мутагенеза ДНК трансфицировали в клетки *E. coli* и индивидуальные фаговые клоны подвергали проверке на наличие *Eco*RI-места на РФ фаговой ДНК. В результате был выделен мутантный фаг M13mp2, имеющий участок узнавания рестриктазы *Eco*RI (см. рис. 2.27). У этого фага в аминокислотной последовательности синтезируемого фрагмента β-галактозидазы в пятом положении произошла замена аспарагиновой кислоты на аспарагин. При этом α-комплементация β-GalM15 не нарушилась, так как данная область α-донора для комплементации несущественна.

При встройке чужеродных фрагментов ДНК по *Eco*RI-месту M13mp2 в большинстве случаев прекращается синтез функционального α-донора. Это происходит в связи с тем, что за счет вставки (в прямой или обратной ориентации) нарушается рамка трансляции α-донора, инициируемой с сигналов гена *lacZ*, либо в клонируемом фрагменте находятся сигналы терминации транскрипции или трансляции. В результате такие гибридные фаги образуют при инфекции мутантных клеток *E. coli* на среде с Xgal бесцветные бляшки, в то время как исходный фаг M13mp2 формирует бляшки синего цвета. Как видим, полученный фаг M13mp2 уже является клонирующим вектором, позволяющим осуществлять прямой отбор гибридов. Однако в том случае, когда встроенный в M13mp2

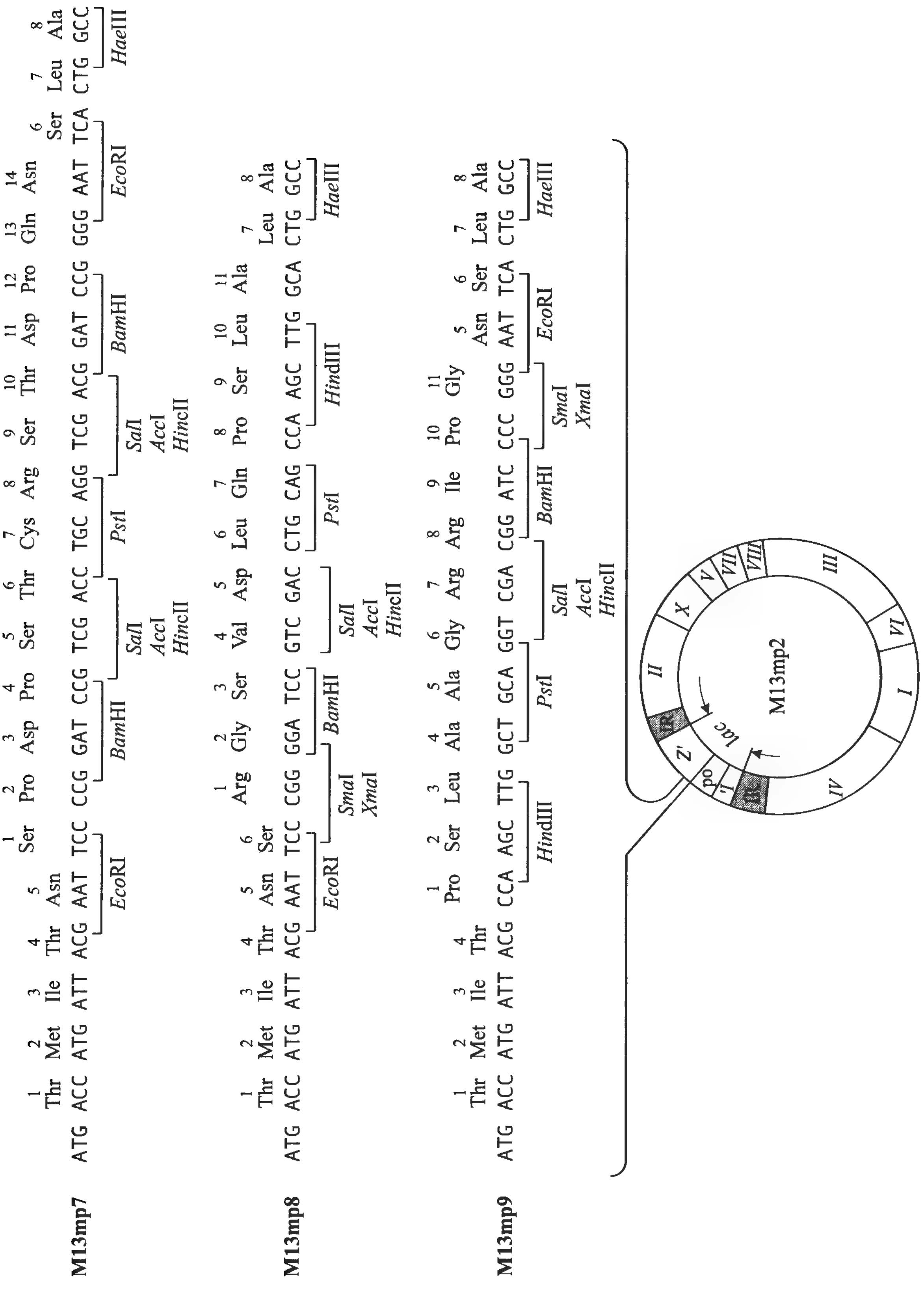


Рис. 2.30. Карта и полилинкерные участки векторных производных фага M13

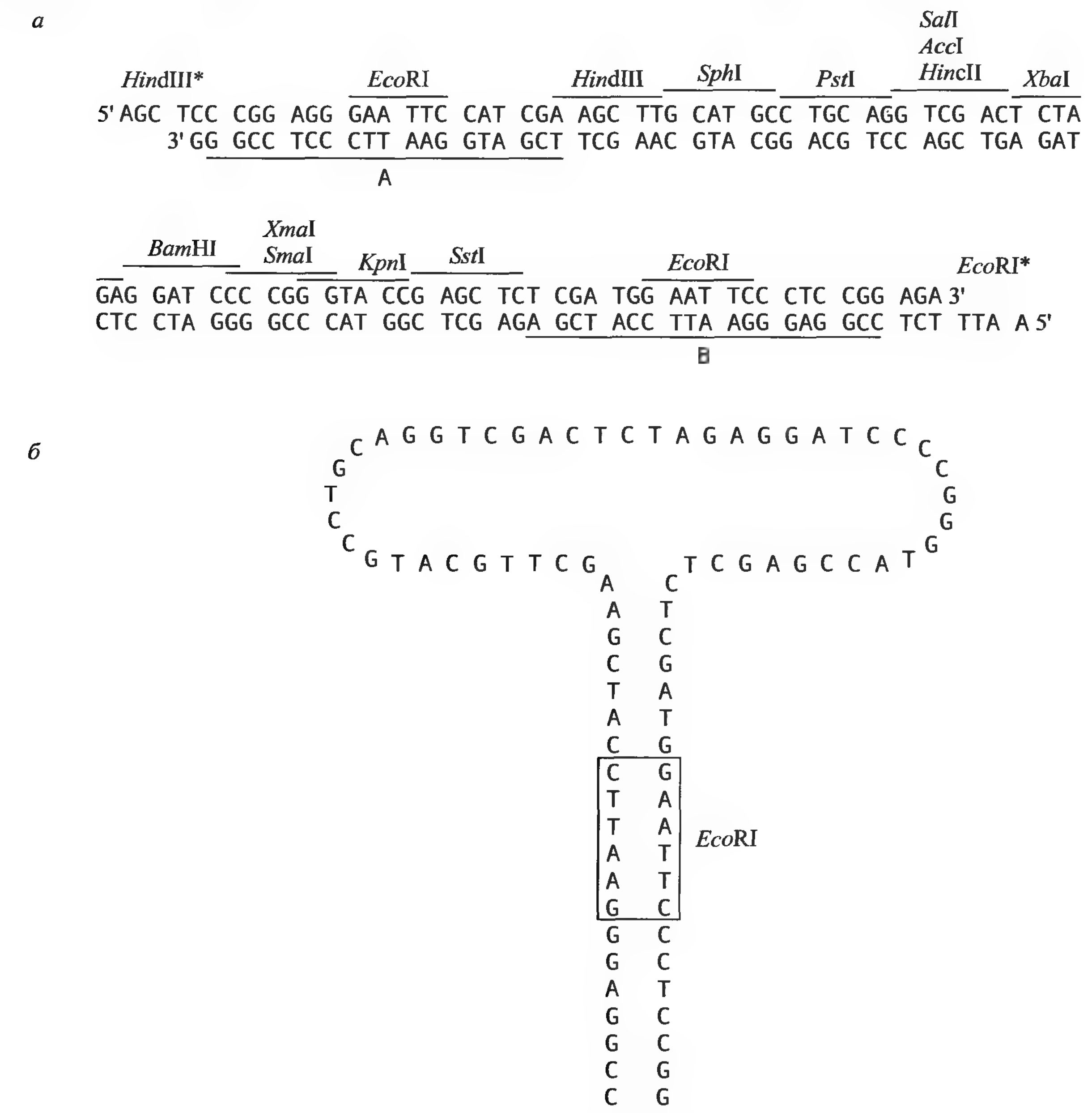


Рис. 2.31. Полилинкер векторного фага SSEV19:

а — последовательность двухцепочечного линкера (черта сверху — участки узнавания рестриктаз; звездочкой обозначены измененные рестрикционные участки; А, В — самокомплементарные последовательности); *б* — одноцепочечная ДНК фага в районе полилинкера

фрагмент ДНК не вносит сигналов терминации трансляции (транскрипции) и не изменяет рамку считывания α-донора, гибрид по фенотипу не отличается от родительского фага. Такой же эффект будет наблюдаться, если в чужеродном фрагменте имеются свой промотор и/или участок связывания рибосом и кодирующая последовательность, рамка трансляции которой совпадает с рамкой трансляции α-донора. В последних случаях по фенотипу гибридные фаги можно отобрать только при противоположной ориентации вставки относительно вектора. Важно подчеркнуть, что в капсиды нитевидных фагов пакуется только одна (+)-цепь ДНК. Поэтому в зависимости от ориентации встройки в составе одноцепочечной ДНК фага будет находиться либо кодирующая, либо комплементарная ей цепь клонируемого гена. Дискриминировать такие варианты гибридов можно простым методом гибридизации нуклеиновых кислот *in situ*.

Для расширения возможностей клонирования фрагментов в ДНК векторного фага M13mp2 по *Eco*RI-месту встроили синтетический полилинкер, который содержит по два сайта действия рестриктаз *Eco*RI, *Bam*HI, *Sal*I, *Acc*I и

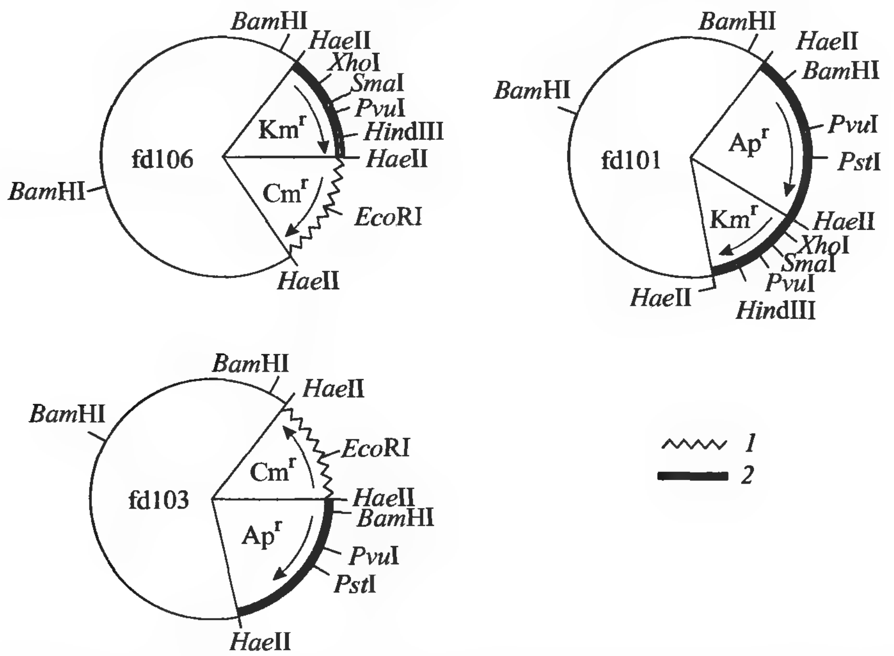


Рис. 2.32. Рестрикционные карты репликативных форм ДНК векторных фагов fd:
1 — фрагмент ДНК плазмиды pACYC177, *2* — pACYC184

*Hinc*II, расположенных симметрично относительно центрального участка действия рестриктазы *Pst*I. Полученный вариант фага обозначен M13mp7 (рис. 2.30). Встройка данного полилинкера в фаг M13mp2 не нарушила рамку трансляции α-донора, а следовательно, и обусловливаемую фагом α-комплементацию, что позволяет широко использовать сконструированный фаг в экспериментах по клонированию фрагментов ДНК. Путем замены последовательности синтетических линкеров достаточно просто созданы разнообразные векторные производные фага M13mp2: M13mp8, M13mp9 (см. рис. 2.30), M13mp10, M13mp11 и др. Используя данный набор векторных фагов, можно решать большой круг генно-инженерных задач.

Дж. Бирнэт с соавторами (1989 г.) предложили новый вариант клонирующего вектора на основе ДНК фага M13. В качестве исходного они взяли фаг M13mp19 (см. рис. 6.12) и его полилинкер, ограниченный участками узнавания рестриктаз *Eco*RI и *Hind*III, заменили другим синтетическим полилинкером размером 96 пн (рис. 2.31, *а*). В структуре нового полилинкера заложена следующая особенность: по краям он имеет взаимокомплементарные последовательности из 19 нуклеотидов, которые в одноцепочечной ДНК зрелого фага способны формировать двухцепочечную «ножку» (см. рис. 2.31, *б*), содержащую нормальный *Eco*RI-участок. Поэтому одноцепочечная ДНК такого фага, обозначенного SSEV19, может быть гидролизована рестриктазой *Eco*RI, и при этом клонированная в полилинкере чужеродная последовательность легко выщепляется. Извлеченный одноцепочечный фрагмент можно пометить с помощью радиоактивных изотопов и использовать в качестве высокоспецифичного гибридизационного зонда и т. п. Нитевидный фаг M13 размножается на клетках *E. coli* до высокого титра (10^{11} БОЕ/мл), тем самым достигается эффективная наработка больших количеств одноцепочечных фрагментов клонированной ДНК.

Кроме векторов — производных фага M13 получен ряд векторов на основе фагов fd и f1. На рис. 2.32 приведена структура нескольких векторных вариантов фага fd, которые были сконструированы по стратегии, разработанной при получении фага M13mp1. В данном случае векторные фаги обусловливают устойчивость к антибиотикам, и поэтому инфицированные ими клетки способны расти на питательной среде с соответствующим антибиотиком. При этом клоны клеток *E. coli*, инфицированных (трансфицированных) гибридными фагами, легко выявляются на селективных средах.

Как видим, векторная система нитевидных фагов разработана достаточно хорошо. Это обусловливает все более активное применение данных векторов для анализа нуклеотидной последовательности клонированных фрагментов ДНК, для мутагенеза клонированных генов и т. д. Все чаще векторные производные ните-

видных фагов используют для экспрессии чужеродных генов в клетках *E. coli*. Особое направление исследований, использующее векторную систему нитевидных фагов, получило название фаговый дисплей.

2.2.7. Фагмиды

Расширить возможности использования одноцепочечных векторов удалось путем совмещения генетических элементов плазмид и нитевидных фагов в составе одной молекулы ДНК. Молекулярные векторы данного типа названы фагмидами. Г. Дотто с соавторами в 1981 г. встроили по *Eco*RI-участку плазмиды pBR322 фрагмент репликативной формы ДНК фага f1 размером 1,3 тпн, который включает все *цис*-действующие элементы генома, необходимые для репликации и морфогенеза фага и располагающиеся в межгенной области IR. Эти же исследователи показали, что при суперинфекции фагом f1 клеток *E. coli*, содержащих созданную плазмиду pD4, примерно половина секретируемых в культуральную среду вирионов несет одноцепочечную ДНК фага f1, а другая половина — одноцепочечную ДНК гибридной плазмиды.

Л. Денте с соавторами в 1983 г. перенесли фрагмент генома фага f1 из плазмиды pD4 в состав плазмид серии pUC (см. 2.2.8), не нарушая генетических детерминант последних. Полученную серию плазмид обозначили pEMBL (рис. 2.33). Эти векторы обладают всеми свойствами родительских плазмид pUC и, кроме того, при инфицировании клеток *E. coli* фагом f1 они способны упаковывать одну из цепей своей ДНК в капсид фага. Какая цепь pEMBL будет упакована в фаговый капсид, зависит от ориентации клонированного фрагмента ДНК фага f1 в плазмиде. Поэтому векторы с разной ориентацией фрагмента фаговой ДНК обозначают либо pEMBL(+), либо pEMBL(–). При использовании pEMBL(+) в капсиды пакуется некодирующая цепь гена β-галактозидазы, а в случае pEMBL(–) — кодирующая.

Фагмиды pBluescipt II KS(+/–), имеющие такую же генетическую структуру как pEMBL19(+/–), но меньший размер (2961 пн), используют во многих лабораториях мира.

Разработанные векторные системы на основе нитевидных фагов *E. coli* находят широкое применение в генно-инженерных экспериментах (см. 7.5).

2.2.8. Векторные плазмиды, обеспечивающие прямой отбор гибридных ДНК

При конструировании гибридов на основе векторных молекул ДНК фага λ или фагов серии M13mp удается осуществлять прямой отбор клонов гибридных фагов. В случае же использования плазмидных векторов прямой отбор клеток, содержащих гибридные плазмиды, часто невозможен. Поэтому возникла необходимость в разработке векторных плазмид с системой прямой селекции гибридных вариантов. Предпринятые исследования привели к созданию широкого спектра таких клонирующих векторов; некоторые из них мы рассмотрим.

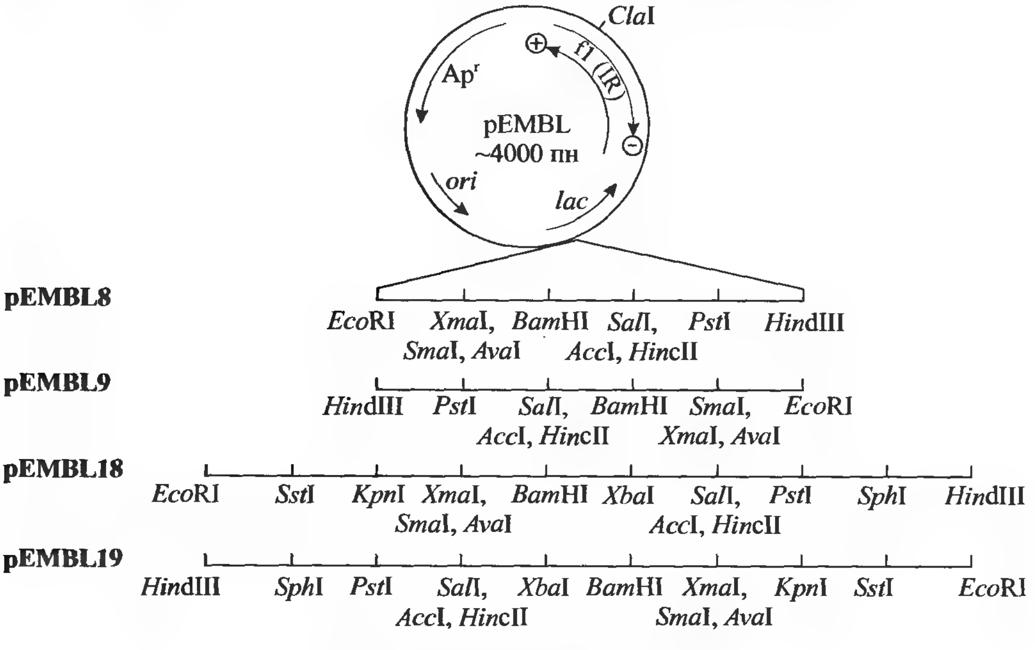


Рис. 2.33. Карты плазмид серии pEMBL

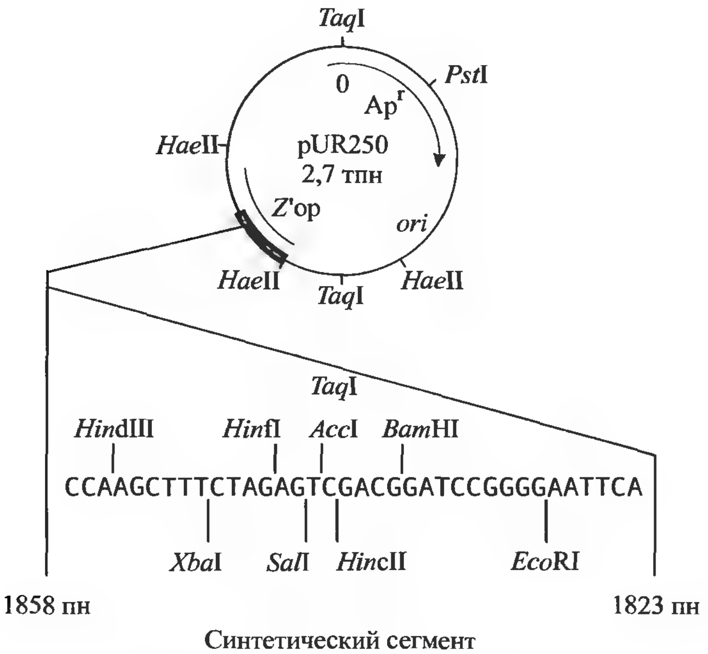


Рис. 2.34. Карта плазмиды pUR250

Выщепляя из ДНК фагов серии M13mp *Hae*II-фрагмент размером 433 пн, содержащий 5′-концевую часть гена *lacZ E. coli*, и перестраивая его в векторную плазмиду, можно получить клонирующие плазмиды с системой прямого отбора гибридов по α-комплементации мутантов β-галактозидазы, аналогичной используемой для фагов M13mp. Отличие состоит лишь в том, что при отборе гибридных клонов после трансформации *E. coli* плазмидами анализируют колонии клеток, а не бляшки. При этом колонии трансформантов, выросшие на среде с антибиотиком и индикаторным красителем Xgal, при наличии в них неповрежденной векторной плазмиды будут синими, а содержащие гибридные плазмиды — белыми. К таким векторам относятся плазмиды серии pUR, созданные У. Рутером начиная с 1980 г. Основу этой серии составила плазмида pUR1, представляющая собой зашитый в кольцо *Eco*RI–*Pvu*II-фрагмент pBR322, содержащий ген *bla* (Ap^r) и область начала репликации *ori* (см. рис. 2.8). По одному из *Hae*II-участков в pUR1 встроили *Hae*II-фрагмент из состава M13mp2, несущий «ген» α-донора β-галактозидазы. Полученную плазмиду обозначили pUR2. Вводя различные полилинкеры, создали набор плазмид, имеющих разный спектр рестрикционных участков для клонирования фрагментов ДНК. Схема одной из плазмид этой серии представлена на рис. 2.34.

Плазмида pUR1 явилась также прародительницей векторов серии pUC, созданных Дж. Виейрой и Дж. Мессингом. У этих плазмид в результате точечных замен нуклеотидных пар изменены в векторной части единственные участки гидролиза рестриктазами *Pst*I (pUC3) и *Hinc*II (pUC5), расположенные в гене β-лактамазы (Ap^r), а также с помощью нуклеазы Bal31 делетирован участок гидролиза рестриктазой *Acc*I (pUC6). Это позволило после встройки в pUC6 *Hae*II-фрагмента из состава M13mp7 создать вектор pUC7, а затем и другие плазмиды этой серии (рис. 2.35), которые широко используются в последние годы, так как в отличие от плазмид pBR могут обеспечивать прямой отбор гибридных вариантов.

Наиболее простую систему прямого отбора гибридных молекул ДНК обеспечивают плазмиды, несущие летальные для клетки-хозяина гены. Если при встройке чужеродных фрагментов ДНК в такой ген нарушается его функция, то гибридные плазмиды уже не будут оказывать летального действия на бактерию, и трансформанты, содержащие гибридные ДНК, будут образовывать колонии. Такой принцип впервые был реализован В. Шуманом (1979 г.) при создании векторной плазмиды pKN80. В плазмиду pRSF2124 (см. рис. 2.6) встроили фрагмент ДНК фага Mu, содержащий нативный ген *kil*, который обладает убивающей (киллерной) функцией по отношению к клеткам, чувствительным к фагу Mu (нелизогенным по данному фагу). Полученная плазмида pKN80 способна эффективно трансформировать лишь клетки, лизогенные по фагу Mu. При встройке в pKN80 фрагментов ДНК по единственному месту гидро-

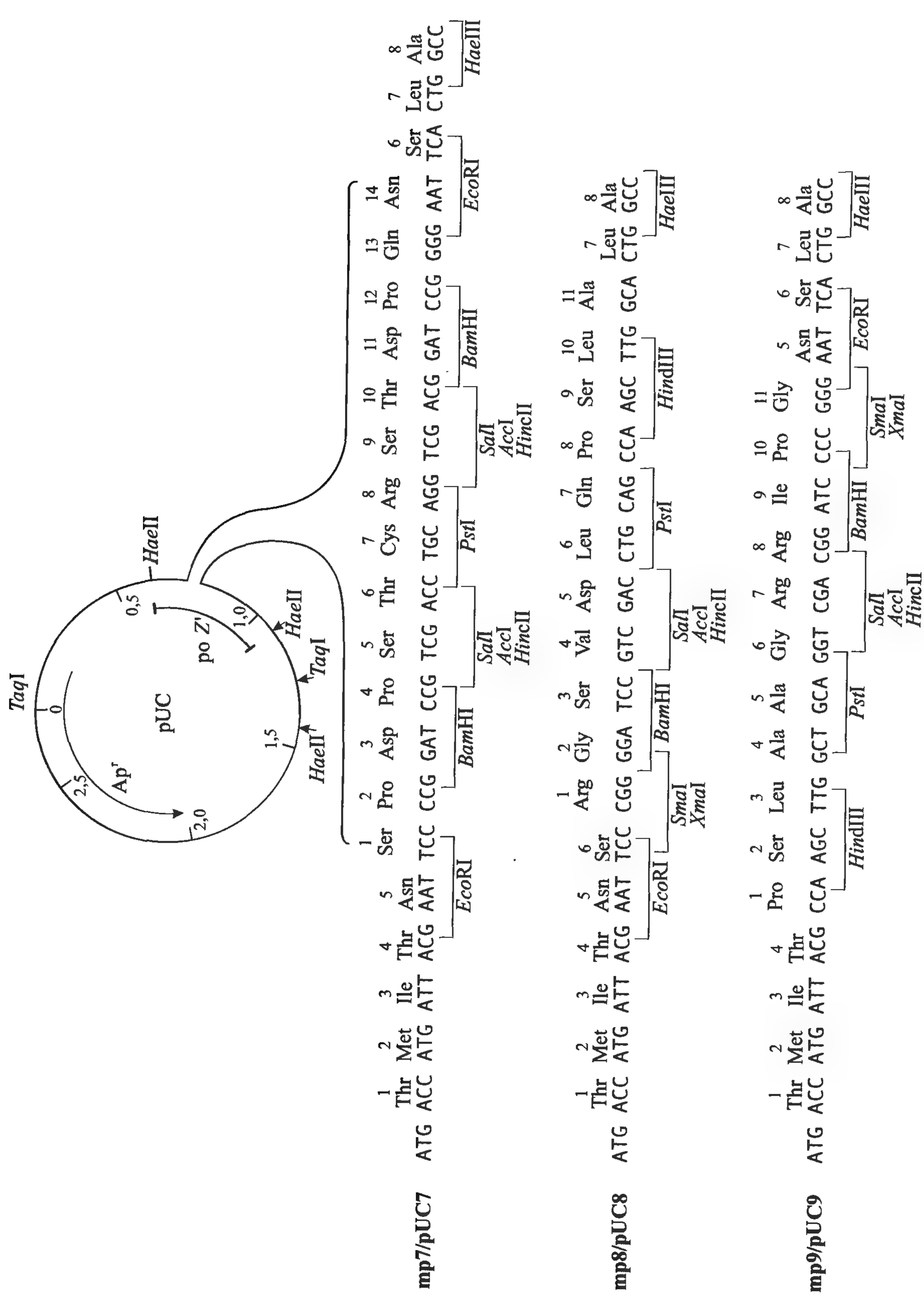


Рис. 2.35. Карта плазмид серии pUC

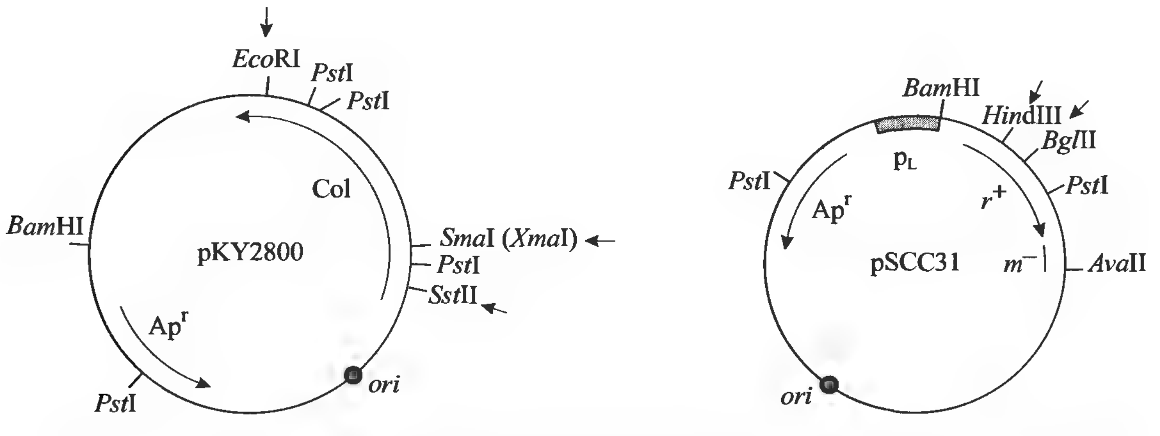


Рис. 2.36. Векторные плазмиды, обеспечивающие прямую селекцию гибридных молекул ДНК. Короткими стрелками указаны уникальные участки встройки фрагментов ДНК

лиза рестриктазой *Hpa*I ген *kil* нарушается, и гибридные плазмиды трансформируют нелизогенные клетки *E. coli* на 1–2 порядка эффективнее, чем исходная плазмида. Это позволяет осуществлять на среде с ампициллином отбор клеток, содержащих гибридные плазмиды.

В 1980 г. описана плазмида pTR262 ($Ap^r Tc^s cI^+$), в которой экспрессия гена *tet* pBR322 находится под контролем репрессора фага λ. Эта плазмида детерминирует фенотип Tc^s, но становится Tc^r после инактивации фагового гена *c*I встройкой в него чужеродных фрагментов ДНК. Поэтому такие гибридные клоны ($Ap^r Tc^r cI^-$) легко отбирать на среде с тетрациклином.

При переносе транспозона Tn*3* в плазмиду ColE1 японскими исследователями была создана плазмида pKY2289, которая детерминировала синтез колицина E1, но не обусловливала устойчивости клеток к этому бактериоцину. На основе pKY2289 была получена плазмида pKY2800 (рис. 2.36), которая не трансформирует клетки *E. coli*, чувствительные к колицину E1. При встройке фрагментов ДНК по участкам рестриктаз *Eco*RI, *Xma*I и *Sst*II ген *cea* нарушается. Это позволяет на среде с ампициллином отбирать клоны клеток, трансформированных только гибридными плазмидами.

Эффективным вектором прямой селекции гибридных ДНК является плазмида pSCC31 (см. рис. 2.36), полученная С. Ченгом и П. Модрихом в 1983 г. из pAN4 в результате делеции структурной части гена метилазы при сохранении гена рестриктазы *Eco*RI. Ген эндонуклеазы *Eco*RI в данной плазмиде находится под контролем промотора p_L фага λ. Важным свойством pSCC31(r^+m^-) является то, что она даже лизогенные по фагу λ клетки *E. coli* трансформирует с эффективностью на пять порядков меньшей, чем исходная pAN4 (r^+m^+) или гибридные плазмиды (r^-m^-), полученные встройкой фрагментов ДНК по участкам *Bgl*II или *Hin*dIII. Таким образом, при использовании данного вектора практически все клетки *E. coli*, вырастающие после трансформации на среде с ампициллином, содержат гибридные плазмиды.

Удобные векторы рассматриваемого типа — плазмиды pAA31(Ap^r*gal*T, K) и pAA31P (Cm^r*gal*T, K), обусловливающие чувствительность к галактозе клеток *E. coli* с делетированным галактозным опероном создал А. Ахмед (1984 г.). Исходно *E. coli*Δ*gal*E, T, K устойчива к галактозе, так как не утилизирует данное соединение. Введение же в эти клетки плазмид, которые детерминируют синтез киназы (ген *gal*K) и трансферазы (*gal*T), но не направляют продукцию эпимеразы (*gal*E), приводит к накоплению в клетках УДФ-галактозы, которая оказывает токсический эффект. В результате встройки фрагментов ДНК по *Hin*dIII-участку векторных плазмид предотвращается экспрессия находящихся в них генов *E. coli gal*K и *gal*T, что приводит к восстановлению у клеток-реципиентов фенотипа Gal^r. Поэтому на среде с соответствующим антибиотиком и галактозой вырастают только трансформанты, содержащие гибридные плазмиды pAA31 или pAA31P.

Как видим, общие подходы к созданию векторных плазмид для прямой селекции их гибридных производных сформулированы и получены разнообразные варианты таких плазмидных векторов, позволяющих существенно облегчить выполнение экспериментов по клонированию фрагментов ДНК.

2.2.9. Векторы, обеспечиеающие экспрессию чужеродных генов в клетках *E. coli*

Большой интерес для генетической инженерии представляют векторы, обеспечивающие правильную и эффективную экспрессию чуже-

Таблица 2.2. **Генетический код (словарь кодонов)**

1-й нуклеотид (5'-конец)	2-й нуклеотид				3-й нуклеотид (3'-конец)
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Таблица 2.3. **Аминокислоты, входящие в состав белков**

Аминокислота	Трехбуквенное обозначение		Однобуквенное обозначение
	русское	латинское	
Аланин	Ала	Ala	A
Аргинин	Арг	Arg	R
Аспарагин	Асн	Asn	N
Аспарагиновая кислота	Асп	Asp	D
Валин	Вал	Val	V
Гистидин	Гис	His	H
Глицин	Гли	Gly	G
Глутамин	Глн	Gln	Q
Глутаминовая кислота	Глу	Glu	E
Изолейцин	Иле	Ile	I
Лейцин	Лей	Leu	L
Лизин	Лиз	Lys	K
Метионин	Мет	Met	M
Пролин	Про	Pro	P
Серин	Сер	Ser	S
Тирозин	Тир	Tyr	Y
Треонин	Тре	Thr	T
Триптофан	Три	Trp	W
Фенилаланин	Фен	Phe	F
Цистеин	Цис	Cys	C

родных генов в клетках-реципиентах. Успешная экспрессия в *E. coli* клонированных генов возможна, если выполняются следующие основные условия:

- кодирующая последовательность чужеродного гена непрерывна;
- ген находится под контролем промотора, который узнается РНК-полимеразой *E. coli*;
- мРНК, считываемая с гена, правильно транслируется белок-синтезирующим аппаратом *E. coli*.

Промотор представляет собой последовательность ДНК, которая обусловливает связывание РНК-полимеразы с ДНК и инициацию синтеза РНК. Поэтому промотор является необходимой составной частью вектора, предназначенного для достижения экспрессии клонированных последовательностей ДНК. Кроме того, возможность и эффективность трансляции транскрибируемой мРНК зависит от наличия на ее 5'-конце участка связывания рибосом (RBS, см. 3.3).

Так как генетический код триплетен и универсален (табл. 2.2), то любая непрерывная кодирующая последовательность может быть экспрессирована в клетках *E. coli* в виде полипептида, являющегося цепочкой аминокислотных остатков (табл. 2.3). Однако организация сигналов инициации транскрипции и трансляции в эукариотических и прокариотических генах в подавляющем большинстве случаев существенно различается (см. 4.1). Поэтому для достижения правильной экспрессии эукариотического гена в клетках *E. coli* необходимо поместить кодирующую последовательность этого гена под бактериальные сигналы экспрессии генов.

Экспрессия целевого белка в составе химерного белка. Данный подход может быть реализован благодаря использованию векторных плазмид или фагов, содержащих бактериальные гены или их проксимальные части. Клонируемый ген вводится в эти векторы так, чтобы регуляторная область бактериального гена оставалась неизменной, а встройка происходила в его структурную часть. При совпадении рамки трансляции бактериального гена с рамкой трансляции встроенного гена синтезируется химерный белок, который обладает по крайней мере частью иммунохимических характеристик целевого экзогенного белка.

Однако не всегда рамки трансляции бактериального и встраиваемого генов совпадают. В таких случаях клонируемая последовательность будет транслироваться неправильно. Чтобы преодолеть это затруднение, создают набо-

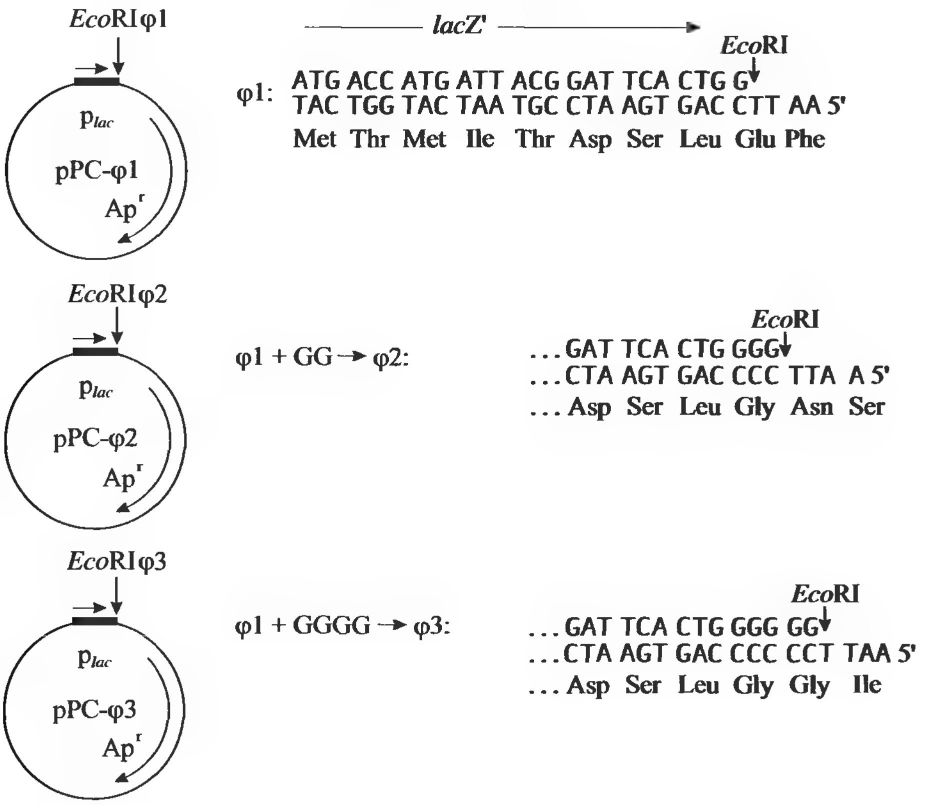


Рис. 2.37. Векторные плазмиды, обеспечивающие сдвиг рамки трансляции клонированных последовательностей ДНК.

lacZ' соответствует нуклеотидной последовательности гена *lacZ* от инициаторного триплета до участка гидролиза рестриктазой *Eco*RI

ры векторов, в состав которых входит одна и та же регуляторная область, но в участке встройки чужеродных последовательностей в каждом векторе имеется сдвиг рамки трансляции относительно другого вектора. Обычно такой сдвиг достигается встройкой коротких синтетических фрагментов. Используя набор из трех векторов, можно клонируемую последовательность поместить во все три возможные фазы трансляции относительно бактериального полипептида, с геном которого объединяется изучаемая ДНК. Одна из таких конструкций обязательно будет обеспечивать правильный синтез целевого белка, ковалентно соединенного на своем N-конце с полипептидом-носителем.

Первая серия фаговых и плазмидных векторов такого типа была сконструирована в 1978 г. сотрудниками лаборатории П. Тиолэ. Структура данных плазмидных векторов приведена на рис. 2.37. Сдвиг рамки трансляции относительно фазы 1 ($\varphi 1$) получали встройкой синтетических линкеров, обеспечивающих добавление к последовательности *lacZ'* двух пар нуклеотидов $\frac{GG}{CC}$ (фаза $\varphi 2$) или четырех $\frac{GGGG}{CCCC}$ (фаза $\varphi 3$). При клонировании кодирующих последовательностей в плазмидах серии pPC-φ происходит их транскрипция и трансляция с регуляторных элементов гена *lacZ* L8UV5 *E. coli*, и синтезируемый белок является химерным, содержащим на N-конце несколько аминокислотных остатков β-галактозидазы.

β-Галактозидазу можно выделить из клеток *E. coli* в гомогенном виде в один этап с помощью аффинной хроматографии на *п*-аминофенил-β-*D*-тиогалактозид-агарозе. Поэтому при создании векторных систем, предназначенных для синтеза чужеродных белков в составе химер с β-галактозидазой, важно было сохранить бо́льшую часть β-галактозидазы в неповрежденном виде, что обеспечило бы специфичность хроматографической очистки химерных белков. Выделенные таким образом химерные белки при иммунизации кроликов вызывают наработку в организме животных антител как на β-галактозидазу, так и на целевой белок.

У. Рутер и Б. Мюллер-Хилл (1983 г.) создали серию векторов pUR290, pUR291, pUR292 (рис. 2.38), различающихся между собой лишь сдвигом рамки трансляции и пригодных для клонирования фрагментов ДНК в 3'-концевой области гена *lacZ* с образованием ферментатив-

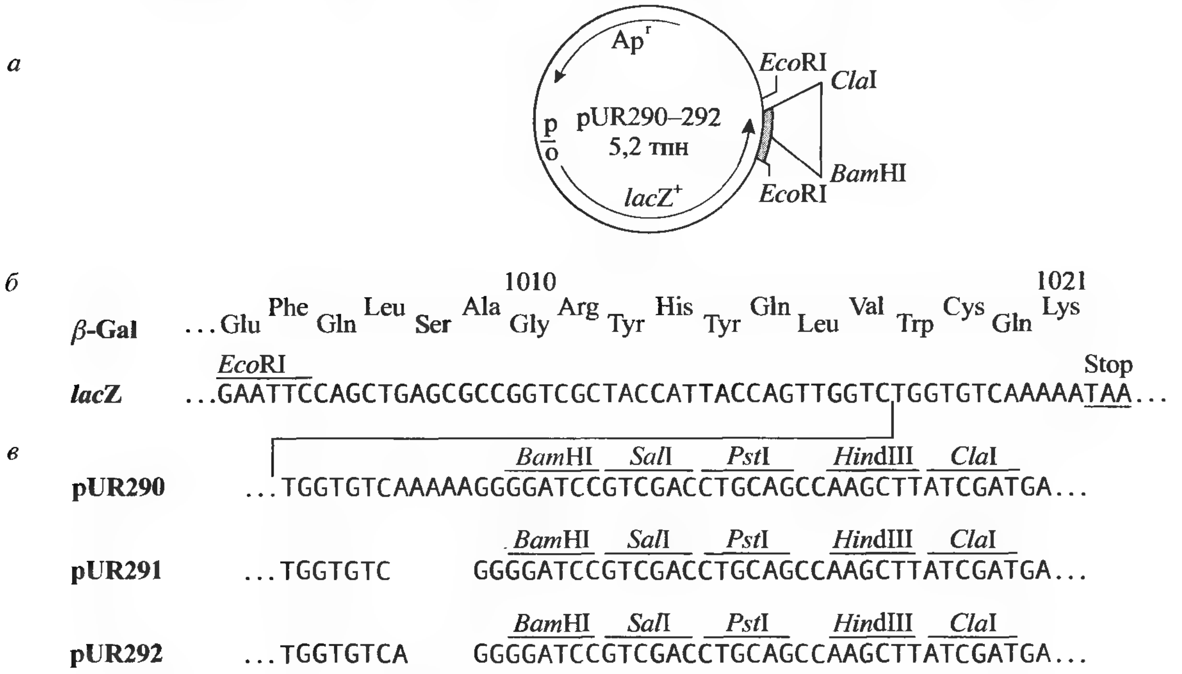


Рис. 2.38. Плазмиды pUR290–292:

а — генетическая и рестрикционная карта; *б* — аминокислотная и нуклеотидная последовательности β-галактозидазы (β-Gal) и ее гена *lac*Z в районе встройки полилинкера (заштрихован на карте плазмиды); *в* — нуклеотидные последовательности полилинкеров

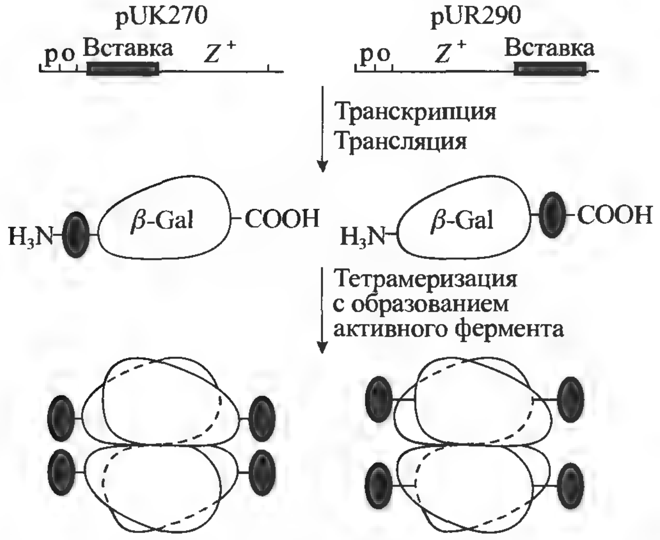
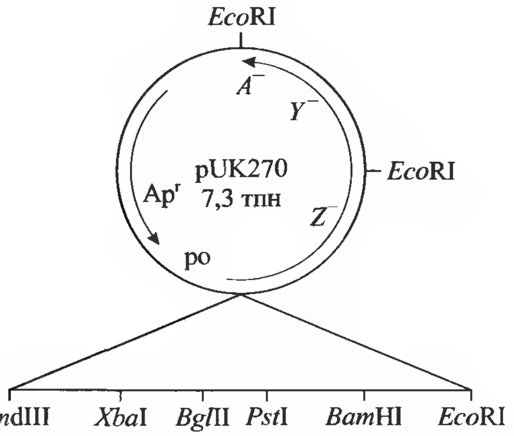


Рис. 2.39. Схема синтеза и сборки ферментативно активных химерных форм β-галактозидазы, детерминируемых гибридными молекулами ДНК, полученными на основе векторов pUK и pUR

но активных β-галактозидаз. Полилинкер, который обеспечивает сдвиг рамки и встройку чужеродного фрагмента ДНК, помещен в ген *lac*Z непосредственно перед стоп-триплетом. Поэтому векторная плазмида, как и ее гибридные производные, обеспечивает синтез активной β-галактозидазы, т. е. фенотипический отбор гибридных клонов в данном случае невозможен. В связи с этим гибридные плазмиды выявляют гибридизацией нуклеиновых кислот *in situ* или радиоиммуноанализом *in situ* целевого белка. Показано, что получаемые в этой экспрессирующей системе химерные белки β-Gal образуют тетрамеры, как и немутантная форма фермента (рис. 2.39). Состыковка с β-галактозидазой обычно приводит к повышению стабильности чужеродного белка в бактериальных клетках.

Другой вариант экспрессирующего вектора на основе гена *lac*Z разработан сотрудниками той же лаборатории в 1982 г. Векторная плазмида pUK270 (рис. 2.40) содержит гены *lac*Z, *lac*Y и часть гена *lac*A лактозного оперона.




```
4
ACG
ACG CCA AGC TTT CTA GAG ATC TTC CAT ACC TAC CAG TTC TGC
     HindIII    XbaI   BglII                          6
                                                     TCA
GCC TGC AGC AAT GGC AAG AAC GTT GCC CGG ATC CGG GGA ATT CA
    PstI                               BamHI       EcoRI
```

Рис. 2.40. Карта плазмиды pUK270 и последовательность нуклеотидов полилинкера. Цифрами обозначены соответствующие триплеты гена *lac*Z дикого типа (до встройки полилинкера)

В результате встройки в начало гена *lac*Z полилинкера, сдвигающего рамку трансляции, плазмида детерминирует фенотип $LacZ^-Y^-$. Выбор плазмиды pUK270 в качестве вектора экспрессии основан на том, что 25 N-концевых АК β-галактозидазы можно без нарушения ее ферментативной активности заменить полипептидом любого размера и происхождения. Плазмиду можно использовать для клонирования ДНК с известной последовательностью в любом из расположенных в полилинкере участков действия рестриктаз. Однако в основном данный вектор применяют при клонировании по *Pst*I-участку случайных фрагментов ДНК с использованием достроенных олиго(dG·dC)-концов (коннекторный метод).

Гибридные клоны можно выявлять по сбраживанию лактозы на среде с Xgal и ИПТГ (см. 2.2.6). Повышенная экспрессия β-галактозидазы, возникающая после восстановления рамки трансляции, неблагоприятна для роста клеток и приводит к накоплению мутантных плазмид, имеющих дефекты по вставке и гену *lac*Z. Поэтому гибридные плазмиды отбирают на штамме *E. coli*, характеризующемся суперэкспрессией *lac*-репрессора (мутация *lac*I^Q). В таком штамме даже при индукции транскрипции лактозного оперона с помощью ИПТГ не происходит полной экспрессии гена *lac*Z, находящегося на плазмидах. Это обусловливает стабильность сохранения *lac*-оперона и встроенных в него фрагментов ДНК в плазмидах.

При клонировании случайных фрагментов с присоединением олиго(dG·dC)-концов число Lac^+-колоний составляет около 5 % общего числа трансформантов. Это обусловлено тем, что фрагменты экзогенной ДНК способны отжигаться с векторной ДНК в двух ориентациях. Половина образовавшихся клонов содержит вставку в неправильной ориентации. Из клонов со вставкой в нужной ориентации только у 1/3 будет соблюдаться фаза трансляции гена *lac*Z по 5′-концу встройки, и лишь 1/3 таких конструкций восстановит фазу трансляции и по 3′-концу встройки, т. е. выход гибридов с правильной ориентацией чужеродной кодирующей последовательности и изменением фенотипа колоний трансформантов с Lac на Lac^+ будет происходить с частотой 1/18. У таких гибридов наблюдается синтез активной химерной β-галактозидазы, содержащей на N-конце чужеродную аминокислотную последовательность (см. рис. 2.39). Радиоиммуноанализом отобранных на селективной среде клонов Lac^+ можно выявить целевые гибриды. При этом не требуется знания последовательности клонируемой ДНК и искомого белка. Достаточно лишь иметь антитела к этому белку и определенного объема экспрессируемую библиотеку генов на основе pUK270.

В ряде лабораторий с использованием рассмотренной выше стратегии созданы наборы экспрессирующих векторных плазмид, в которых уникальные участки рестрикции введены в трех разных рамках трансляции в структурные части генов *bla* (β-лактамазы), *trp*E (антранилатсинтетазы) *E. coli*, белка A *Staphylococcus aureus* и др. Такие экспрессирующие плазмиды

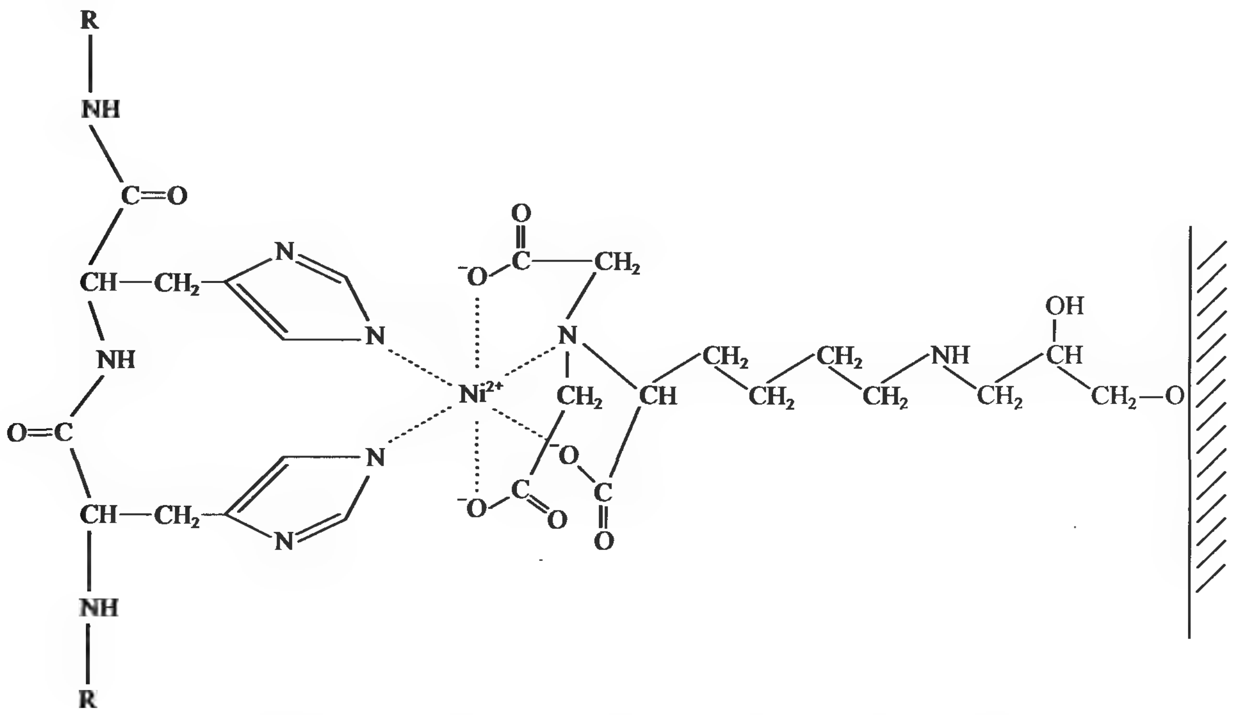


Рис. 2.41. Схема взаимодействия Ni-NTA с последовательностью 6×His

производятся для продажи разными фирмами, специализирующимися в области генетической инженерии.

Интересный подход к достижению эффективной продукции и простой очистки целевых белков предложен в 1991 г. Фирмой QIAGEN разработан хелатирующий адсорбент на основе нитрилотриуксусной кислоты (nitrilotriacetic acid, NTA). NTA достаточно прочно связывает катион никеля, который в свою очередь способен эффективно взаимодействовать с пептидной последовательностью из нескольких остатков гистидина (рис. 2.41). Ni-NTA-агароза высокоэффективно связывает последовательность из шести гистидинов (6xHis) и обеспечивает одностадийную очистку белка, содержащего 6×His, до 95%-ной гомогенности даже в том случае, когда его содержание в суммарном белке клетки составляет менее 1 %.

Было создано семейство плазмид pQE (рис. 2.42), в состав которых включены следующие элементы: 1) репликон ColE1; 2) оптимизированный промоторно-операторный элемент, состоящий из промотора фага T5, узнаваемого РНК-полимеразой *E. coli*, и двух *lac*-операторов для эффективной репрессии сильного фагового промотора; 3) два строгих терминатора транскрипции — t_0 фага λ и T1 оперона рибосомной РНК *E. coli* для предотвращения транскрипции других последовательностей плазмиды и тем самым для стабилизации ее наследования при делении клеток; 4) синтетический участок связывания рибосом RBSII, обеспечивающий высокий уровень трансляции; 5) последовательность 6xHis, расположенную на 5′- или 3′-конце клонируемой целевой последовательности; 6) полилинкер, содержащий уникальные участки действия разных рестриктаз.

В качестве хозяина плазмид pQE используют штаммы *E. coli* с мутацией *lac*I^{Q}, конститутивно продуцирующие *lac*-репрессор (см. 2.2.6), что обеспечивает эффективное блокирование транскрипции с сильного промотора фага T5. Индукция транскрипции достигается добавлением в среду ИПТГ.

Оказалось, что взаимодействие 6×His с Ni-NTA-матрицей не зависит от конформации синтезируемого химерного белка. При этом 6×His имеет значительно меньшие размеры, чем другие полипептиды-носители. При физиологических значениях pH 6×His не заряжен и слабоиммуногенен, поэтому химерный белок может быть с успехом использован для получения антител против целевого белка, кодирующая последовательность которого встроена в вектор pQE.

Экспрессия индивидуального целевого белка. При создании продуцентов определенных белков (в том числе человека и животных) наибольший интерес представляют генетические конструкции, обеспечивающие эффективный синтез в клетке-реципиенте чужеродного белка без добавления к нему каких-либо посторонних аминокислотных последовательностей.

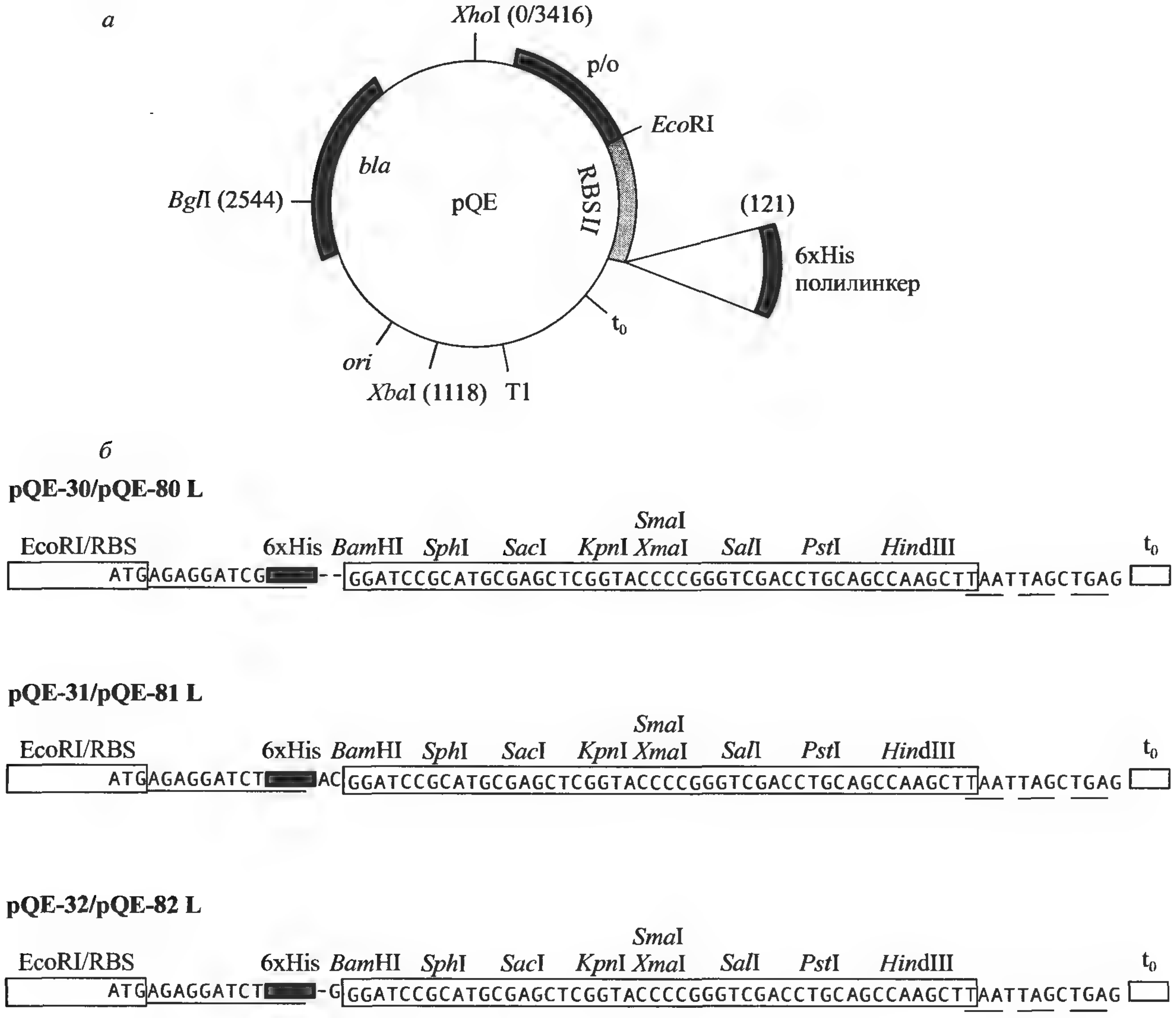


Рис. 2.42. Схема векторных плазмид серии pQE (*а*)
и последовательность нуклеотидов в районе полилинкера (*б*).
Подчеркнуты терминаторные триплеты, обведены последовательности полилинкера

Одним из вариантов решения этой проблемы стало создание А. Шацманом и М. Розенбергом с соавторами (1983 г.) векторной системы pAS (рис. 2.43), которая обеспечивает эффективную строго регулируемую транскрипцию встроенной последовательности и может направлять синтез чужеродного белка в свободном виде. Плазмидный вектор pAS является образцом высокоинтеллектуального конструирования молекул ДНК. Он состоит из упорядоченно расположенных генетических блоков. Транскрипция чужеродных фрагментов ДНК в pAS инициируется с сильного фагового промотора p_L.

В клетках *E. coli*, лизогенных по фагу λ, промотор p_L находится в репрессированном состоянии за счет взаимодействия операторного района o_L с фаговым репрессором cI. В том случае, когда профаг содержит ген термочувствительного репрессора, индукция транскрипции с промотора p_L достигается переносом клеток с температуры 30 °С на 42 °С (при этом белок cI инактивируется). При использовании лизогена дикого типа по гену *c*I индукцию можно осуществлять химическим путем, добавляя в среду повреждающие ДНК агенты, такие, например, как налидиксовая кислота. В этом случае происходит индукция синтеза протеазы recA, которая расщепляет белок cI фага λ. В качестве клетки-реципиента используют такие штаммы *E. coli*, у которых профаг дефектен по функциям репликации. Поэтому после индукции фаговое потомство не формируется и клетки не лизируются.

Для обеспечения строгой регуляции транскрипции после промотора p_L введен блок из другого района генома фага λ, содержащий терми-

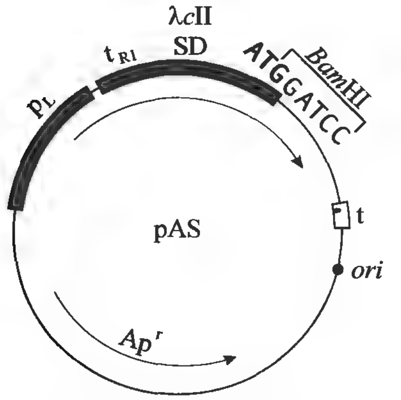


Рис. 2.43. Карта векторной плазмиды pAS

натор транскрипции t_{R1} (см. рис. 2.15). Транскрипция, инициируемая с промотора p_L, может преодолевать данный терминатор только при наличии в клетках *E. coli* белка антитерминатора N фага λ. Это достигается также путем индукции профага. Таким образом, после индукции профага происходят два события: разрушение белка cI и снятие репрессии с промотора p_L; синтез белка N и его связывание с РНК-полимеразой клетки, что обеспечивает прохождение ферментом терминатора t_{R1}.

Следующий район в структуре pAS представляет собой природный участок связывания рибосом гена *c*II фага λ (SD-ATG). Участок узнавания рестриктазы *Bam*HI расположен так, что данный фермент расщепляет плазмиду сразу за инициаторным ATG-триплетом. Это позволяет точно подстраивать чужеродные кодирующие последовательности (обычно с помощью синтетических сегментов ДНК) и достигать эффективного синтеза целевых белков в свободном виде. После чужеродной встройки в векторе pAS расположен ρ-независимый терминатор транскрипции. Данный терминатор обеспечивает стабильность сохранения гибридной плазмиды в клетках *E. coli*, так как в его отсутствие интенсивная транскрипция с промотора p_L может подавлять инициацию репликации плазмиды с участка *ori*.

Альтернативным рассмотренному является подход, при котором клонируемую кодирующую последовательность состыковывают с синтетическим участком связывания рибосом. Такой ген можно встраивать в любую точку структурной части выбранного бактериального гена. В процессе транскрипции гибридного гена будет синтезироваться химерная мРНК, содержащая два участка связывания рибосом: природный участок на нетранслируемом 5′-конце и искусственный во внутренней последовательности этой же мРНК. Инициация трансляции с искусственного RBS приведет к синтезу в бактерии автономного чужеродного белка. В 1981 г. по такой схеме в *E. coli* был синтезирован в свободном виде малый t-антиген вируса SV40. Более того, используя эту модельную систему, удалось сравнить эффективность функционирования *in vivo* разных синтетических RBS.

Логическим развитием данного направления явилась работа С. Н. Щелкунова с сотрудниками, которые в плазмиду pBR327 по местам гидролиза рестриктазами *Eco*RI и *Hin*dIII встроили синтетический фрагмент ДНК, состоящий из участка связывания рибосом гена фосфорибозил-антранилаттрансферазы *trp*D *E. coli* (RBS1) и кодирующей последовательности зрелой формы интерферона α2 человека (HuIF-α2) (рис. 2.44). После встраивания нарушился промотор гена *tet*, но участок связывания рибосом (RBS2) сохранился. Сконструированную плазмиду обозначили pEMB101. Если в pEMB101 встроить по *Eco*RI-месту любой фрагмент ДНК, содержащий промотор, направляющий транскрипцию в сторону плазмидного гена *tet*, то будет синтезироваться бицистронная мРНК и на среде с тетрациклином можно отобрать клоны клеток *E. coli*, содержащих такие гибридные плазмиды. В данном случае трансляция tet-белка инициируется с RBS2 на химерной мРНК. Показано, что селектируемые таким образом гибридные плазмиды обеспечивают синтез в *E. coli* нативного интерферона человека (инициация с RBS1), продукция которого пропорциональна детерминируемому ими уровню устойчивости клеток к тетрациклину. К клонируемой в подобных векторах последовательности можно подстраивать множество различных промоторных областей и изучать их влияние на уровень продукции белка, кодируемого этой последовательностью.

Интересной областью исследований является также создание векторов, при встройке в которые кодирующих последовательностей формируется гибридный участок связывания рибосом. В данном случае в векторной части плазмиды содержится последовательность, включающая промотор и SD-участок (см. 3.3), а встраиваемый структурный ген должен содержать инициаторный триплет ATG. В такой гибридной плазмиде транскрипция чужеродного белка инициируется с промотора вектора, а трансляция — с гибридного участка связывания рибосом. При этом синтезируются нативные чужеродные полипептиды.

Строгая репрессия транскрипции целевого гена. В том случае, когда экзогенный бе-

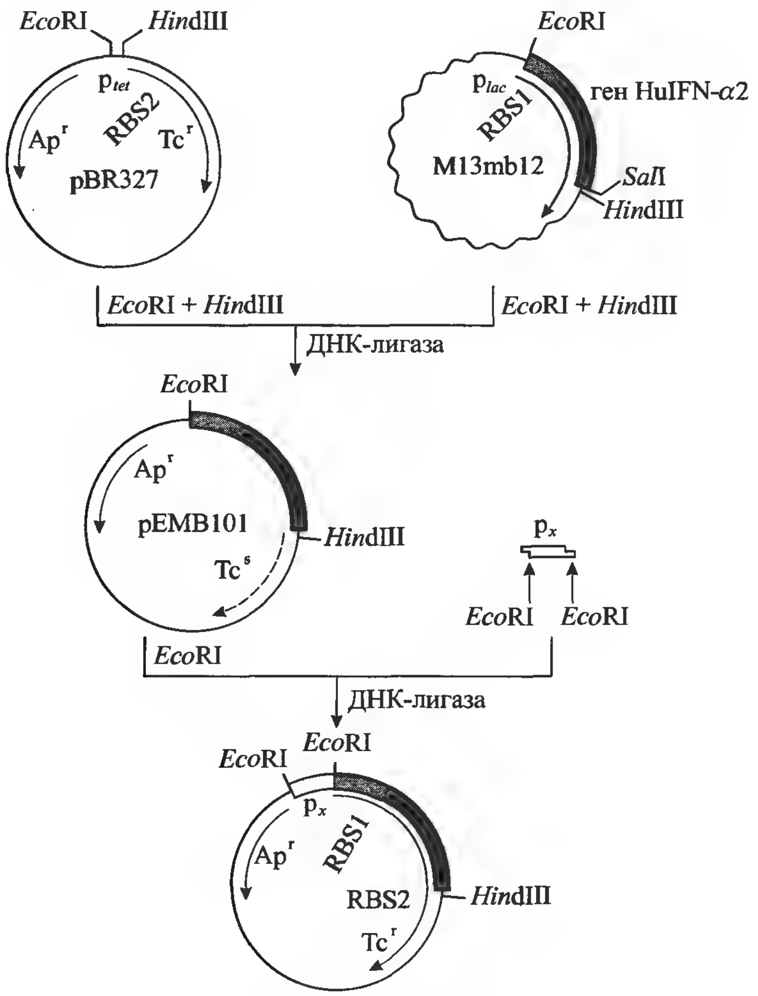


Рис. 2.44. Схема создания плазмиды pEMB101 и ее промоторсодержащих производных

лок токсичен для клеток *E. coli*, необходимо использовать специальные векторы экспрессии, которые имеют систему строгой репрессии транскрипции клонированных последовательностей. Культуру, содержащую такую гибридную плазмиду, выращивают до высокой плотности в условиях репрессии транскрипции чужеродного гена, а затем индуцируют экспрессию этого гена. До момента, когда проявится токсический эффект синтезируемого белка на клетки, он успевает наработаться в достаточно больших количествах, так как концентрация клеток в культуре высока. К векторам такого типа можно отнести ранее рассмотренные плазмиды pSCC31 (см. рис. 2.36) и pAS (см. рис. 2.43).

Другой вариант строгой репрессии реализован в плазмиде pDOC55 (рис. 2.45), описанной К. О'Коннором и К. Тиммисом в 1987 г. В данном случае транскрипция с репрессируемого белком cI промотора p_L фага λ дополнительно подавляется встречной транскрипцией с промотора p_{lac}. Полагают, что дополнительная репрессия обусловлена синтезом с p_{lac} антисмысловой РНК, которая может образовывать дуплексы с матричной РНК встроенного гена, синтезируемой с p_L, и блокировать ее трансляцию. Кроме того, возможна интерференция за счет столкновения молекул РНК-полимераз, движущихся навстречу друг другу.

Созданный вектор опробован при клонировании гена *tra*T конъюгативных плазмид группы F, который кодирует основной липопротеин внешней мембраны плазмидосодержащих клеток *E. coli*, а также при встройке гена рестриктазы *Eco*RI. Фрагмент ДНК, содержащий гены рестриктазы и метилазы *Eco*RI, встраивали в pDOC55 по *Sma*I-участку. Отбирали плазмиду, в которой гены *Eco*RI-системы имели ту же ориентацию, что и промотор p_L. В гене метилазы *Eco*RI ферментативно выщепляли сегмент, что приводило к инактивации гена, и полученную ДНК циклизовали с помощью ДНК-лигазы. Полученным препаратом ДНК трансформировали клетки *E. coli*, лизогенные по фагу λ, в условиях индукции транскрипции с промото-

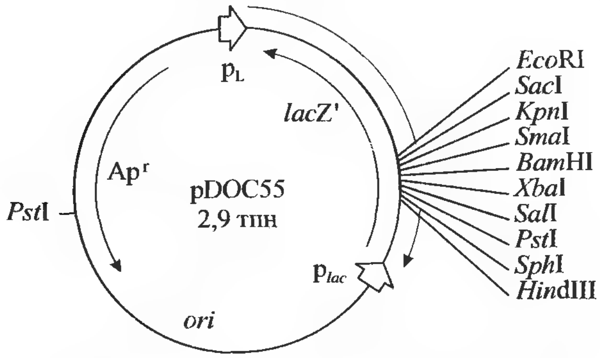


Рис. 2.45. Карта плазмиды строгой репрессии экспрессии клонируемых генов

ра p_{lac} (добавлением в среду ИПТГ), а также без индукции. В первом случае на среде с ампициллином выявлялось около 10^4 трансформантов на 1 мкг ДНК, а в последнем трансформанты обнаружены не были, так как синтезируемые даже в условиях репрессии промотора p_L следовые количества рестриктазы *Eco*RI оказываются губительными для бактерии. Эти результаты со всей очевидностью демонстрируют высокий уровень репрессии для системы векторной плазмиды pDOC55, достигаемый при индуцированной (конститутивной) транскрипции с промотора p_{lac} (см. рис. 2.45). Это позволяет клонировать в ее составе гены, чьи белковые продукты высокотоксичны для клеток-реципиентов, и в нужный момент индуцировать их экспрессию.

Таким образом, проблема создания векторов, обеспечивающих правильную и эффективную экспрессию чужеродных генов в клетках *E. coli*, в целом решена. Однако это не означает, что не будут создаваться новые, более эффективные векторы экспрессии, в том числе обеспечивающие секрецию целевых белков из цитоплазмы клетки.

2.2.10. Векторы E. coli, детерминирующие секрецию чужеродных белков

Около 25 % суммарного белка, синтезируемого *E. coli*, находится в плазматической мембране, периплазматическом пространстве и наружной мембране клетки. Обнаружено, что многие белки, локализованные в этих структурах, являются секретируемыми и первоначально синтезируются в виде предшественников, содержащих на N-конце лидерную (сигнальную) последовательность. Согласно сигнальной гипотезе Г. Блобеля (рис. 2.46) эти N-концевые последовательности пре-белков служат в качестве сигналов, инициирующих секрецию белков из цитоплазмы клетки, и их принято называть ***сигнальными пептидами***. В процессе синтеза пре-белка сигнальный пептид обусловливает взаимодействие рибосомы с так называемой частицей, узнающей сигнальный пептид (SPR), которая в свою очередь обеспечивает связывание данного комплекса со специфичным участком на мембране. После связывания комплекса с мембраной синтез белка продолжается с одновременной секрецией синтезируемой аминокислотной последовательности. Сразу после завершения секреции или в ходе ее сигнальный пептид отщепляется эндопептидазой, названной ***сигнальной пептидазой***. В клетке *E. coli* сигнальная пептидаза находится на периплазматической поверхности плазматической мембраны. Отщепленный сигнальный пептид затем гидролизуется ***пептидазой сигнального пептида***.

В настоящее время накопилось множество данных о том, что механизм секреции белков через плазматические мембраны во всех типах прокариотических и эукариотических клеток в основном одинаков. Анализ большого числа последовательностей эукариотических и прокариотических сигнальных пептидов выявил существенное сходство их организации. Длина сигнальных пептидов обычно составляет 15–25 АК. Заряженные аминокислоты в основном располагаются среди первых пяти–семи, и их суммарный заряд находится в пределах от +1 до +3. Средняя часть сигнального пептида состоит из кластера гидрофобных аминокислот. Гидрофобность этих пептидов существенна для выполнения ими функции экспорта белка из цитоплазмы, а суммарный заряд влияет на эффективность как трансляции, так и экспорта пре-белка. Сигнальные пептиды содержат информацию, необходимую для их отщепления от пре-белка. Кроме сигнального пептида на процесс секреции влияет и последовательность основной части пре-белка.

Механизм секреции белков в клетках *E. coli* интенсивно изучается. В данной грамотрицательной бактерии секреция белков из цитоплазмы может происходить во внешнюю и плазматическую мембраны, а также в периплазматическое пространство, разделяющее эти мембраны (рис. 2.47). Секреция белков из *E. coli* во внешнюю среду происходит крайне редко.

Первым внеклеточным белком грамотрицательных бактерий, для которого Дж. Полнеру с соавторами в 1987 г. удалось установить механизм секреции из клеток (экскреции), явилась протеаза диплококка *Neisseria gonorrhoeae*, специфичная к иммуноглобулину IgA человека. Ген

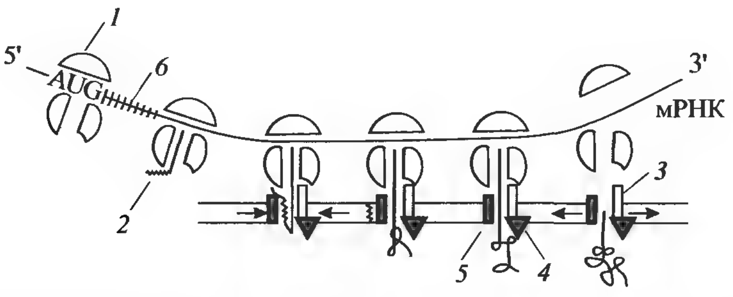


Рис. 2.46. Транслокация секретируемых белков через плазматическую мембрану:

1 — рибосома; *2* — сигнальный пептид; *3* — рибосомный рецептор; *4* — сигнальная пептидаза; *5* — сигнальный рецептор; *6* — кодоны сигнального пептида на мРНК

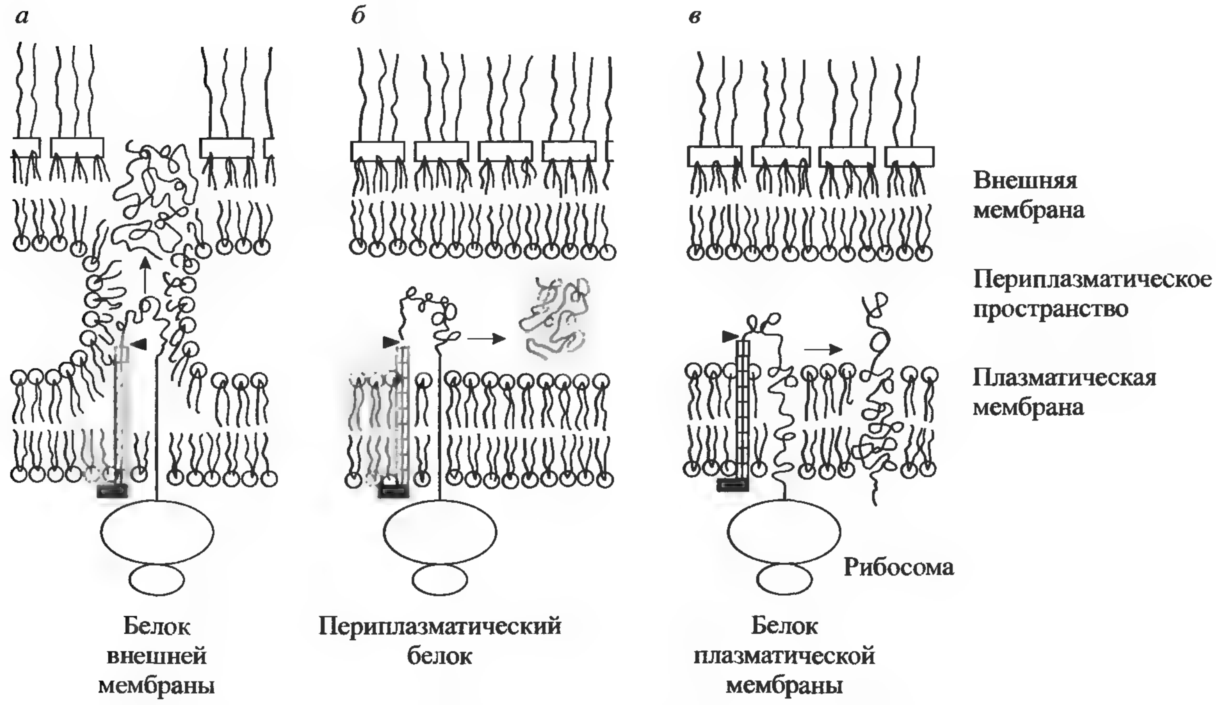


Рис. 2.47. Варианты секреции и конечной локализации белков в клетках *E. coli*.

Черным треугольником отмечено место отщепления сигнального пептида

этой протеазы клонировали в *E. coli*, и был продемонстрирован синтез и образование внеклеточного активного фермента в данной гетерологичной системе. Зрелый фермент имеет молекулярную массу 106 кДа, но первоначально он синтезируется в виде предшественника массой 169 кДа. Предшественник содержит три функциональных домена: N-концевой лидер, который обеспечивает транспорт белка через плазматическую мембрану, собственно протеазу и С-концевой домен-помощник, необходимый для прохождения макромолекулы через внешнюю мембрану. N-концевой лидер (сигнальный пептид) отщепляется в процессе секреции белка-предшественника через плазматическую мембрану в периплазматическое пространство (рис. 2.48). После этого С-концевой домен-помощник выполняет роль поры (белка порина) для экскреции протеазного домена через внешнюю мембрану. После выхода протеазы из клетки от нее в результате автопротеолиза отщепляется С-концевой домен. Образовавшаяся проформа затем распадается на зрелую форму IgA-протеазы и небольшой стабильный α-протеин (см. рис. 2.48).

Данный механизм самостоятельной экскреции белков из грамотрицательных бактерий, по-видимому, является общим, поскольку для сериновой протеазы *Serratia marcescens*, секретирующейся и из клеток *E. coli*, первоначально синтезируется предшественник, имеющий N-концевой сигнальный пептид и С-концевую последовательность, отсутствующие в зрелой форме внеклеточного фермента.

Наличие довольно сложного механизма экскреции крупных белков из грамотрицательных

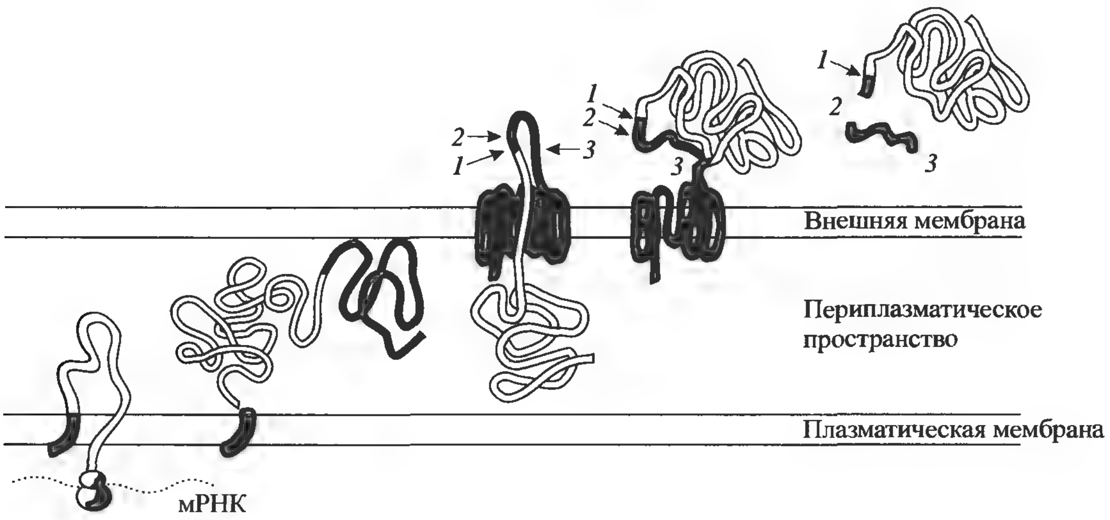


Рис. 2.48. Модель секреции IgA-протеазы за пределы грамотрицательной клетки: *1, 2, 3* — точки автопротеолиза белка

бактериальных клеток не позволяет пока создать генетические конструкции, обеспечивающие синтез химерных белков-предшественников, способных секретировать во внешнюю среду чужеродные для бактерий высокомолекулярные полипептиды.

Более просто организованная система секреции белков через плазматическую мембрану вполне может быть смоделирована в эксперименте. Данный подход представляет значительный интерес для биотехнологии, так как заманчиво методами генетической инженерии создавать гибридные гены, которые обусловливали бы секрецию чужеродных белков из цитоплазмы клетки. Большинство эукариотических белков, синтезируемых в генно-инженерно сконструированных штаммах *E. coli*, сохраняют N-концевой метионин и тем самым отличаются от природных форм этих белков. Преодолеть данное затруднение можно, состыковав кодирующие последовательности зрелой формы изучаемого белка и какого-либо сигнального пептида *E. coli*. При правильном процессинге синтезируемого химерного белка в *E. coli* будет образовываться полноценный эукариотический полипептид. Более того, секреция может защитить чужеродный белок от многочисленных протеаз цитоплазмы клетки и за счет этого повысить уровень его синтеза штаммом-продуцентом.

Периплазматические белки грамотрицательных бактерий выделяются в процессе легкого осмотического шока, которому клетки подвергают после ферментативного гидролиза пептидогликанового слоя клеточной стенки. Белки периплазмы составляют лишь 15 % всего белка клетки. Поэтому эффективно синтезируемый и секретируемый в периплазму чужеродный белок можно выделить без примеси основных белков бактерии. Также достаточно просто можно отделять целевой белок от содержимого клетки, если этот белок секретируется в плазматическую или внешнюю мембрану.

Генно-инженерные опыты продемонстрировали, что синтезируемые в *E. coli* чужеродные прокариотические и эукариотические пре-белки, содержащие сигнальные пептиды, способны правильно процессироваться и секретироваться в периплазматическое пространство клеток. Более того, в ряде работ показано, что гибридные гены, состоящие из «генов» сигнальных пептидов *E. coli* и изучаемых структурных генов, обусловливают в *E. coli* синтез химерных белков и их секрецию. Эти данные указывают на значительную универсальность организации сигнальных пептидов и в связи с этим — на перспективность создания специализированных векторов экспрессии–секреции для клеток *E. coli*.

Первые плазмидные векторы такого типа созданы в 1984 г. на основе плазмиды pBR322 и последовательности ДНК, которая содержит тандемно расположенные промоторы генов липопротеина и β-галактозидазы *E. coli*, состыкованные с «геном» сигнального пептида белка OmpA *E. coli* (основной белок наружной мембраны клеточной стенки). Причем полученные векторы pIN-III-*omp*A-1, pIN-III-*omp*A-2 и pIN-III-*omp*A-3 обеспечивают разные рамки трансляции встроенных в них кодирующих последовательностей. Встройка в pIN-III-*omp*A структурного гена зрелой формы β-лактамазы привела к секреции β-лактамазы в периплазму клеток

E. coli. При этом уровень продукции целевого белка был настолько высок, что достигал 20 % суммарного белка клетки.

С использованием данной векторной системы созданы также штаммы *E. coli*, в которых происходит суперпродукция и секреция в периплазму таких белков, как гормон роста и интерферон α2 человека, нуклеаза А стафилококка, рибонуклеаза Т1 из *Aspergillus oryzae* и ряд других. Интересный результат получили японские исследователи при клонировании в составе pIN-III-*ompA* кДНК Ca^{2+}-связывающего фотобелка аэкворина. Этот белок размером 189 АК не только секретировался через плазматическую мембрану *E. coli*, но и эффективно преодолевал наружную мембрану клеток, выходя во внешнюю среду. Механизм этого процесса пока не ясен.

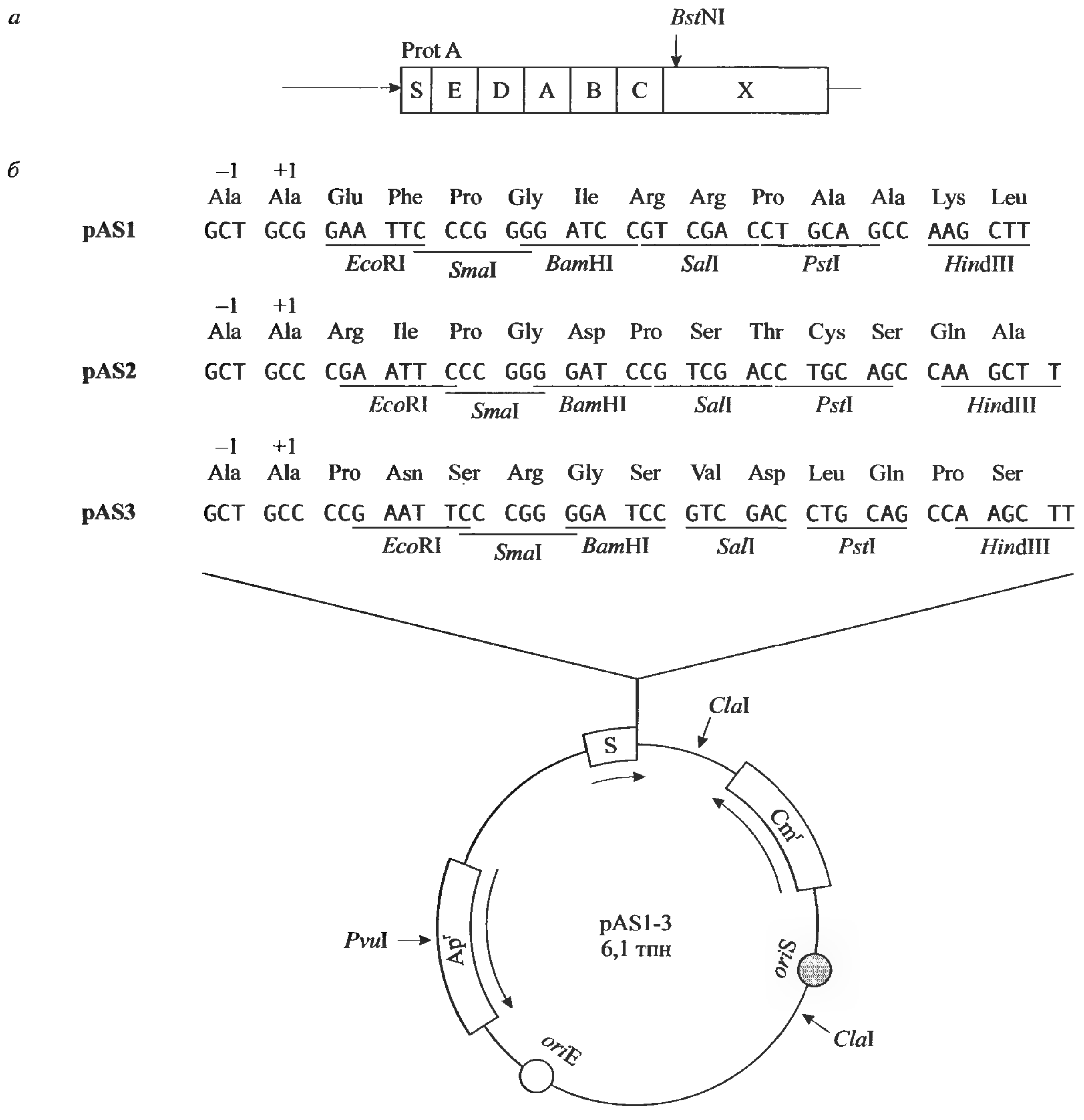
М. Юхлен с соавторами создали серию векторов экспрессии–секреции на основе гена белка A *Staphylococcus aureus* и челночной плазмиды pRIT4, способной реплицироваться как в клетках *E. coli*, так и в клетках *S. aureus* и *Bacillus subtilis*. Стафилококковый белок (SpA, или ProtA) интересен тем, что он в ряде штаммов *S. aureus* синтезируется в большом количестве и секретируется из клеток. Исходно SpA синтезируется в виде пре-SpA и имеет на N-конце сигнальный пептид (рис. 2.49, *а*). На С-конце SpA находится район X, который ответствен за связывание белка А с пептидогликаном *S. aureus*. Во внутренней части SpA содержится 5 районов с высокой степенью взаимной гомологии, каждый из которых в белке формирует домен. По крайней мере 4 из них (D, A, B, C) связываются с F_c-районами многих иммуноглобулинов. Поэтому SpA просто и надежно извлекается из любой смеси белков в процессе аффинной хроматографии на носителе с пришитыми иммуноглобулинами IgG.

Первые векторы pAS1–3 (см. рис. 2.49, *б*) содержали 5′-концевую часть гена SpA, включающую сигналы инициации транскрипции и трансляции, а также последовательность, кодирующую сигнальный пептид. Полилинкер и сдвиг рамки трансляции обеспечивают возможность использовать данные векторы экспрессии–секреции для клонирования различных фрагментов ДНК. В первых же экспериментах было показано, что при встройке в такой вектор ген-эквивалента зрелой формы щелочной фосфатазы *E. coli* (периплазматический белок) химерный белок секретируется в периплазматическое пространство (для клеток *E. coli*) или во внешнюю среду (для грамположительных клеток *S. aureus*), образуя активную форму фосфатазы. При встройке в этот же вектор кодирующей последовательности гена β-галактозидазы *E. coli* (цитоплазматический белок) секреции химерного белка не наблюдалось.

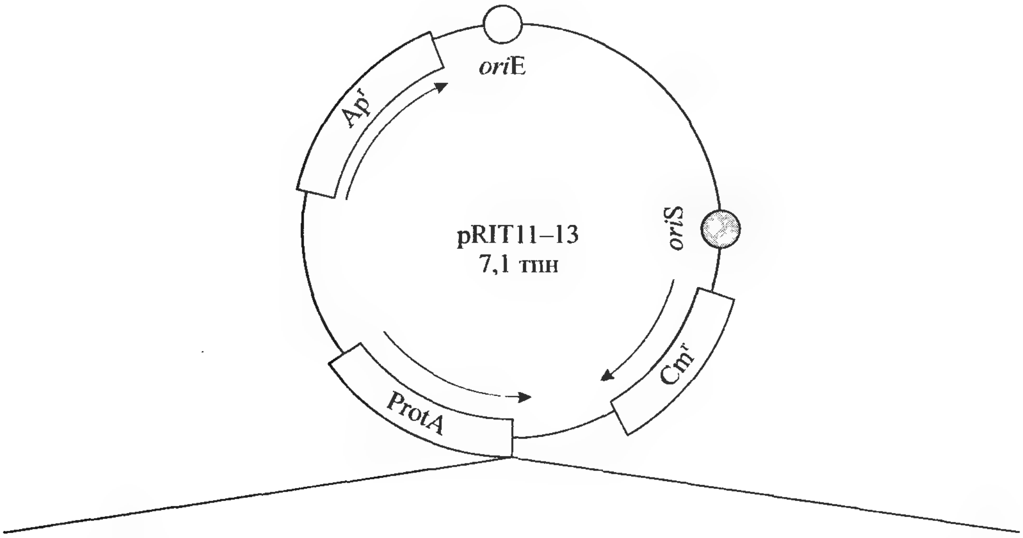
Аналогичные результаты получили японские исследователи на системе плазмид экспрессии–секреции, созданных на основе элементов гена щелочной фосфатазы *E. coli*. Эти векторы обеспечивали направляемую сигнальным пептидом фосфатазы секрецию в периплазму *E. coli* α-амилазы *B. subtilis*, β-лактамазы *E. coli*, α-интерферона и эпидермального фактора роста человека. В то же время цитоплазматические белки *E. coli*, такие как β-галактозидаза, фактор элонгации Tu и хлорамфениколацетилтрансфераза, соединенные с сигнальным пептидом щелочной фосфатазы *E. coli*, не секретировались из цитоплазмы и не процессировались с N-конца. В условиях суперэкспрессии эти химерные белки образовывали в цитоплазме тельца включения (см. 3.4). Полученные результаты со всей очевидностью демонстрируют, что секреция чужеродного белка в бактериальных клетках обеспечивается не только сигнальным пептидом, но и существенно зависит от структуры исследуемого белка.

Используя векторы серии pRIT (см. рис. 2.49, *в*) М. Юхлен с соавторами показали, что химерные белки в ряде случаев способны секретироваться не только в периплазматическое пространство клеток *E. coli*, но и во внешнюю среду. В частности, при встройке в pRIT ген-эквивалентов инсулиноподобных факторов роста человека IGF-I и IGF-II в *E. coli* синтезировались химерные белки, которые экскретировались из клеток. Хроматографией на IgG-сефарозе химерные белки извлекали из питательной среды и затем специфическим химическим гидролизом отщепляли последовательности низкомолекулярных IGF-I и IGF-II.

Используя в качестве «носителя» N-концевую часть белка OmpF, представляющего собой белок пор (порин) внешней мембраны *E. coli*, К. Нагахари с соавторами добились секреции во внешнюю среду из клеток *E. coli* β-эндорфина человека (опиоидный пептид, являющийся частью 61–91 АК β-липотропина и образуемый из него в результате специфического посттрансляционного процессинга *in vivo*). Химерный белок, синтезируемый в *E. coli*, состоял из 22 АК сигнального пептида белка OmpF, первых 8 АК белка OmpF, стыкующей последовательности (4 АК) и β-эндорфина (31 АК). В процессе секреции через плазматическую мембрану сигнальный пептид отщеплялся, и образовывался короткий полипептид длиной 43 АК. Этот поли-



пептид выходил через наружную мембрану во внешнюю среду. Механизм наблюдаемой экскреции не ясен, однако полагают, что малый размер данного гидрофильного полипептида обеспечивает ему выход через поры пассивной диффузии, образуемые в наружной мембране белками-поринами OmpF и OmpC. N-концевая последовательность (8 АК) белка OmpF в экскреции полипептида роли не играет, так как удаление ее не сказывается на возможности выхода β-эндорфина в окружающую среду. Когда в *E. coli* синтезировался более крупный химерный полипептид с последовательностью β-эндорфина, имеющий в периплазматическом пространстве размер 71 АК, он уже не секретировался через наружную мембрану. Используя штамм *E. coli* с пониженной протеазной активностью, авторам удалось получить высокий выход (2,8 мг/л культуры) β-эндорфина человека, который выделяли прямо из питательной среды. В периплазме клеток при этом β-эндорфин практически отсутствовал (< 0, 01 мг/л культуры).



pRIT11	Lys	Pro	Asp	Asp	Asp	Lys	Glu	Phe	Pro	Gly	Ile	Arg	Arg	Pro	Ala
	AAG	CCT	GAT	GAC	GAT	AAA	GAA	TTC	CCG	GGG	ATC	CGT	CGA	CCT	GCA
pRIT12	Lys	Pro	Gly	Gly	Pro	Gly	Ile	Pro	Gly	Asp	Pro	Ser	Thr	Cys	Ser
	AAG	CCT	GGT	GGA	CCA	GGA	ATT	CCC	GGG	GAT	CCG	TCG	ACC	TGC	AGC
pRIT13	Lys	Pro	Ile	Glu	Gly	Arg	Asn	Ser	Arg	Gly	Ser	Val	Asp	Leu	Gln
	AAG	CCT	ATC	GAA	GGT	AGG	AAT	TCC	CGG	GGA	TCC	GTC	GAC	CTG	CAG

*Eco*RI *Sma*I *Bam*HI *Sal*I *Pst*I

Рис. 2.49. Структура плазмид экспрессии–секреции на основе элементов гена белка А (ProtA) *Staphylococcus aureus*:

а — ген ProtA; *б* — векторы со встройкой кодирующих последовательностей сразу после «гена» сигнального пептида ProtA; *в* — плазмиды, содержащие ген ProtA от начала до участка *Bst*NI (см. *а*), после которого идет полилинкер. *ori*E и *ori*S — области инициации репликации плазмид *E. coli* и *S. aureus* соответственно

Как видим, в ряде случаев чужеродные белки при секреции из цитоплазмы способны преодолевать и барьер наружной мембраны. Причины этого пока не ясны. Но, по-видимому, наблюдаемый эффект обусловлен какими-то особенностями структуры этих белков.

Генетические исследования *E. coli* позволили выявить по меньшей мере два гена, кодирующих белки PrlA и SecA, необходимые для секреции белков через плазматическую мембрану у этих бактерий. Дж. Лаззарони и Р. Портельер обнаружили мутанты клеток *E. coli*, у которых периплазматические белки, такие как щелочная фосфатаза, рибонуклеаза I, β-лактамаза плазмиды pBR322, могут выходить во внешнюю среду. Такие мутанты обозначают *lky* (от англ. leaky — имеющий течь). Мутанты по гену *lky*B имеют сниженное содержание во внешней мембране, по крайней мере, белков OmpF и LamB, что, по-видимому, обусловливает ее повышенную проницаемость. Такие мутанты могут быть использованы для создания штаммов *E. coli*, эф-

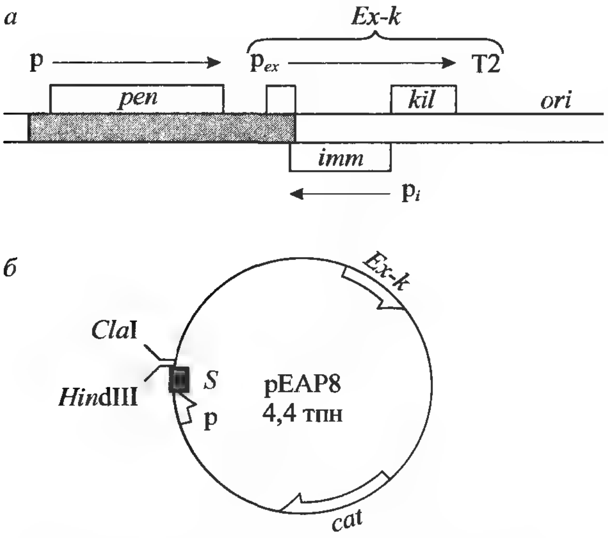


Рис. 2.50. Векторы экспрессии–экскреции *E. coli*:

а — гибридная плазмида pMB9 в районе встройки фрагмента ДНК *B.* sp. (заштрихован), содержащего ген пенициллиназы (*pen*); *б* — векторная плазмида pEAP8 (p — промотор; *S* — ген-эквивалент сигнального пептида гена *pen*)

фективно продуцирующих и экскретирующих в окружающую среду чужеродные белки.

Интересную и перспективную для биотехнологии векторную систему экспрессии–экскреции чужеродных белков разработали японские ученые под руководством К. Хорикоши. В 1986 г. при клонировании в составе плазмиды pMB9 фрагмента хромосомной ДНК бактерии *Bacillus* sp., содержащего ген пенициллиназы, они обнаружили, что синтезируемая в *E. coli* пенициллиназа с высокой эффективностью экскретируется из клеток в окружающую среду. Дальнейшие исследования позволили установить причину данного явления. Плазмида pMB9 содержит ген *kil*, который ответствен за выход из клеток колицина E1. Однако в составе pMB9 ген *kil* не экспрессируется, поскольку в отличие от родительской плазмиды ColE1 в pMB9 утрачены как ген продукции колицина E1, так и его промотор, который необходим для экспрессии гена *kil* (см. рис. 2.4, 2.5). При анализе гибридной плазмиды оказалось, что на ближайшем к гену *kil* конце встроенного фрагмента ДНК имеется промотороподобная последовательность *Ex*, которая узнается РНК-полимеразой *E. coli* и направляет с умеренной эффективностью транскрипцию сегмента ДНК, содержащего ген *kil* (рис. 2.50, *а*). Продукция белка Kil приводит к тому, что внешняя мембрана *E. coli* становится проницаемой для белков периплазматического пространства и они выходят в окружающую среду.

В результате серии генно-инженерных реконструкций был создан вектор экскреции pEAP8 (см. рис. 2.50, *б*), который содержит селективный маркер Cm^r, промотор, участок связывания рибосом и ген-эквивалент сигнального пептида пенициллиназы *Bacillus* sp., а также искусственный генетический элемент *Ex-k*. На примере гена гормона роста человека (hGH) продемонстрировано, что такой вектор обеспечивает в *E. coli* эффективный синтез, секрецию через плазматическую мембрану с отщеплением сигнального пептида и экскрецию из клеток зрелой формы hGH.

Х. Хсюнг с соавторами (1989 г.) использовали такой же подход, но в несколько иной форме. В клетки *E. coli* они одновременно вводили две гибридные плазмиды, полученные на основе разных совместимых векторов. Одна плазмида (pJL3) несла под контролем регулируемого промотора p_{lac} последовательность, кодирующую белок BRP (bacteriocin release protein), функцией которого является высвобождение из клеток *E. coli* бактериоцина CloDF13. Другая плазмида (pOmpA-hGH2) содержала под теми же сигналами инициации транскрипции ген-эквивалент гормона роста человека, состыкованный с геном сигнального пептида белка OmpA *E. coli*.

Белок BRP (аналог белка Kil плазмиды ColE1) является небольшим полипептидом (28 АК), который кодируется плазмидой pCloDF133 и синтезируется в виде предшественника с сигнальным пептидом длиной 21 АК, секретируется через плазматическую мембрану в периплазматическое пространство, где он N-ацетилируется и встраивается во внешнюю мембрану. Там BRP может активировать фосфолипазу А, что приводит к формированию зон проницаемости в клеточной оболочке, через которые белки могут высвобождаться в культуральную среду. При репрессии транскрипции с p_{lac} в клетках *E. coli*, содержащих одновременно плазмиды pJL3 и pOmpA-hGH2, гормон роста практически не синтезировался. При умеренной индукции с помощью ИПТГ (20 мкМ) наблюдались эффективный синтез и экскреция hGH в культуральную среду без лизиса клеток. При более высоких концентрациях индуктора (40 мкМ) отмечалась сверхпродукция BRP и клетки лизировались, что значительно снижало выход гормона роста. При слабой индукции (5 мкМ ИПТГ) экскреция hGH не наблюдалась. Таким образом, данная система экспрессии–экскреции требует оптимизации.

Дальнейшее развитие данного направления исследований позволяет надеяться на создание

технологически перспективной векторной системы *E. coli*, аналогичной системе экспрессии–секреции грамположительных бактерий. В частности, создан биореактор, в котором клетки *E. coli* иммобилизованы на силиконовом носителе и эффективно продуцируют и экскретируют из клеток термостабильную α-амилазу.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Безбородов А. М., Астапович Н. И. Секреция ферментов у микроорганизмов. М.: Наука, 1984. 70 с.

Добрынин В. Н., Коробко В. Г., Шиигарова Л. Н. и др. Плазмидные векторы pBBV для клонирования и регенерации фрагментов ДНК с любой концевой нуклеотидной последовательностью // Докл. АН СССР. 1984. Т. 278. С. 1002–1005.

Забаровский Е. Р., Алликметс Р. Л. Векторы для конструирования представительных геномных клонотек // Молекул. биология. 1989. Т. 23. С. 1494–1515.

Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхардта и др. М.: Мир, 1984. 472 с.

Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. 436 с.

Новое в клонировании ДНК: Методы / Под ред. Д. Гловера. М.: Мир, 1989. 368 с.

Рис Э., Стернберг М. От клеток к атомам: Иллюстрированное введение в молекулярную биологию. М.: Мир, 1988. 144 с.

Синяков А. Н., Серпинский О. И., Данилюк Н. К. и др. Плазмиды pMB123 и pMB124 — векторы для получения субфрагментов ДНК с произвольными «липкими» концами // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. С. 638–647.

Стейниер Р., Эдельберг Э., Ингрэм Дж. Мир микробов. М.: Мир, 1979. Т. 2. 334 с.

Шлегель Г. Общая микробиология. М.: Мир, 1987. 566 с.

Щелкунов С. Н. Конструирование гибридных молекул ДНК. Новосибирск: Наука, 1987. 168 с.

Янковский Н. К. Конструирование и анализ клонотек генов. М.: ВИНИТИ, 1989. 252 с. (Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. Т. 16).

Abrahmsen L., Moks T., Nilsson B. et al. Analysis of signals for secretion in the Staphylococcal protein A gene // EMBO J. 1985. Vol. 4. P. 3901–3906.

Abrahmsen L., Moks T., Nilsson B., Uhlen M. Secretion of human insulin-like growth factor I to the culture medium of *Escherichia coli* // Nucl. Acids Res. 1986. Vol. 14. P. 7487–7500.

Ahmed A. Plasmid vectors for positive galactose-resistance selection of cloned DNA in *Escherichia coli* // Gene. 1984. Vol. 28. P. 37–43.

Amann E., Brosius J., Ptashne M. Vectors bearing a hybrid *trp-lac* promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli* // Gene. 1983. Vol. 25. P. 167–178.

Bates P. F., Swift R. A. Double *cos* site vectors: simplified cosmid cloning // Gene. 1983. Vol. 26. P. 137–146.

Biernat J., Gobel U. B., Koster H. New bacteriophage vectors for the large scale production of single stranded insert DNA // J. Biochem. Biophys. Methods. 1989. Vol. 19. P. 155–168.

Chan P. T., Ohmori H., Tomizawa J. I., Lebowitz J. Nucleotide sequence and gene organization of ColE1 DNA // J. Biol. Chem. 1985. Vol. 260. P. 8925–8935.

Close T. J., Christmann J. L., Rodriguez R. L. M13 bacteriophage and pUC plasmids containing DNA inserts but still capable of β-galactosidase α-complementation // Gene. 1983. Vol. 23. P. 131–136.

Dente L., Cesareni G., Cortese R. pEMBL: a new family of single stranded plasmids // Nucl. Acids Res. 1983. Vol. 11. P. 1645–1655.

Fognini-Lefebvre N., Lazzaroni J. C., Portalier R. *tolA*, *tolB* and *excC*, three cistrons involved in the control of pleiotropic release of periplasmic proteins by *Escherichia coli* K12 // Mol. Gen. Genet. 1987. Vol. 209. P. 391–395.

Inouye M., Halgoua S. Secretion and membrane localization of proteins in *Escherichia coli* // Crit. Rev. Biochem. 1980. Vol. 7. P. 339–371.

Kato C., Kobayashi T., Kudo T. et al. Construction of an excretion vector and extracellular production of human growth hormone from *Escherichia coli* // Gene. 1987. Vol. 54. P. 197–202.

Kobayashi T., Kato C., Kudo T., Horikoshi K. Excretion of the penicillinase of an alkalophilic *Bacillus* sp. through the *Escherichia coli* outer membrane is caused by insertional activation of the *kil* gene in plasmid pMB9 // J. Bacteriol. 1986. Vol. 166. P. 728–732.

Hsiung H. M., Cantrell A., Luirink J. et al. Use of bacteriocin release protein in *E. coli* for excretion of human growth hormone into the culture medium // Bio/Technology. 1989. Vol. 7. P. 267–271.

Langley K. E., Villarejo M. R., Fowler A. V. et al. Molecular basis of β-galactosidase α-complementation // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1975. Vol. 72. P. 1254–1257.

Lazzaroni J. C., Fognini-Lefebvre N., Portalier R. C. Cloning of the *lky*B (*tol*B) gene of *Escherichia coli* K12 and characterization of its product // Mol. Gen. Genet. 1986. Vol. 204. P. 285–288.

Lazzaroni J. C., Portalier R. Production of extracellular alkaline phosphatase by *Escherichia coli* K12 periplasmic-leaky mutants carrying phoA^{+} plasmids // Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1982. Vol. 16. P. 146–150.

Lowenadler B., Nilsson B., Abrahmsen L. et al. Production of specific antibodies against protein A fusion proteins // EMBO J. 1986. Vol. 5. P. 2393–2398.

Messing J., Vieira J. A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments // Gene. 1982. Vol. 19. P. 269–276.

Morino T., Morita M., Seya K. et al. Construction of a runaway vector and its use for a high-level expression of a cloned human superoxide dismutase gene // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1988. Vol. 28. P. 170–175.

Murakami Y., Furusato T., Kato C. et al. Construction of new excretion vectors: two and three tandemly located promoters are active for extracellular protein production from *Escherichia coli* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1989. Vol. 30. P. 619–623.

Nagahari K., Kanaya S., Munakata K. et al. Secretion into the culture medium of a foreign gene product from *Escherichia coli*: use of the *omp*F gene for secretion of human β-endorphin // EMBO J. 1985. Vol. 4. P. 3589–3592.

O'Connor C. D., Humphreys G. O. Expression of the *Eco*RI restriction–modification system and the construction of positive-selection cloning vectors // Gene. 1982. Vol. 20. P. 219–229.

Oriel P. Amylase production by *Escherichia coli* immobilized in silicone foam // Biotechnology Letters. 1988. Vol. 10. P. 113–116.

Pohlner J., Halter R., Beyreuther K., Meyer T. F. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease // Nature. 1987. Vol. 325. P. 458–462.

Quaas R., McKeown Y., Stanssers P. et al. Expression of the chemically synthesized gene for ribonuclease T1 in *Escherichia coli* using a secretion cloning vector // Eur. J. Biochem. 1988. Vol. 173. P. 617–622.

Shatzman A. R., Rosenberg M. The pAS vector system and its application to heterologous gene expression in *Escherichia coli* // Hepatology. 1987. Vol. 7. P. 30S–35S.

Shizuya H., Birren B., Kim U.-J. et al. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1992. Vol. 89. P. 8794–8797.

Tabata S., Higashitani A., Takanami M. et al. Construction of an ordered cosmid collection of the *Escherichia coli* K12 W3110 chromosome // J. Bacteriol. 1989. Vol. 171. P. 1214–1218.

Vasilenco I., De Kruijff B., Verkleij A. J. Polymorphic phase behaviour of cardiolipin from bovine heart and from *Bacillus subtilis* as detected by ^{31}P-NMR and freeze-fracture techniques // Biochim. Biophys. Acta. 1982. Vol. 684. P. 282–286.

Vieira J., Messing J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers // Gene. 1982. Vol. 19. P. 259–268.

Welpley J. K., Fowler A. V., Zabin I. β-Galactosidase α-complementation // J. Biol. Chem. 1981. Vol. 256. P. 6804–6810.

Yanagida N., Uozumi T., Beppu T. Specific excretion of *Serratia marcescens* protease through the outer membrane of *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 1986. Vol. 166. P. 937–944.

Zhang S., Yan L., Zubay G. Regulation of gene expression in plasmid ColE1: delayed expression of the *kil* gene // J. Bacteriol. 1988. Vol. 170. P. 5460–5467.

Глава 3
ДОСТИЖЕНИЕ ПОВЫШЕННОЙ ПРОДУКЦИИ БЕЛКОВ, КОДИРУЕМЫХ ГЕНАМИ, КЛОНИРОВАННЫМИ В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

Одна из важнейших задач генетической инженерии — создание условий для эффективной экспрессии клонируемых в бактериях генов. Разработка путей оптимизации такой экспрессии — шаг к получению высокопродуктивных бактериальных штаммов, направляющих синтез необходимых белков и других биологически активных соединений. Повышенная продукция белков, детерминируемых клонированными генами, достигается при выполнении ряда условий:

- для клонирования должны использоваться многокопийные векторы, так как при этом в клетке изучаемый ген находится в высокой дозе, что обычно обусловливает повышенный уровень его белкового продукта;
- клонируемая кодирующая последовательность должна быть помещена под контроль промотора, который эффективно узнается РНК-полимеразой клетки;
- синтезируемая мРНК должна быть относительно стабильной и эффективно транслироваться;
- чужеродный белок, синтезируемый в клетках, не должен подвергаться быстрой деградации бактериальными протеазами.

Рассмотрим подробнее экспериментальные подходы к увеличению синтеза белков, кодирующие последовательности которых клонированы в клетках *E. coli*.

3.1. ЭФФЕКТ ДОЗЫ ГЕНА ПРИ МОЛЕКУЛЯРНОМ КЛОНИРОВАНИИ

В классической генетике хорошо известен так называемый эффект дозы гена, заключающийся в том, что увеличение в геноме какого-либо организма количества копий определенного гена вызывает пропорциональное повышение уровня его белкового продукта. С появлением методологии генетической инженерии использование эффекта дозы гена стало первым шагом к повышению выхода белковых продуктов клонируемых генов. Высокая доза гена достигается благодаря использованию многокопийных векторов, создаваемых для клеток *E. coli* на основе ДНК фагов и плазмид.

Для конструирования многокопийных плазмидных векторов используют плазмиды либо с ослабленным контролем репликации, либо с термочувствительными мутациями по функции репликации. Из векторов первого типа широкое распространение получили плазмида ColE1 и ее многочисленные производные (см. 2.2.1), находящиеся в обычных условиях в клетке в количестве 20–60 копий.

Уже в первых генно-инженерных работах было показано, что встройка в плазмиду ColE1 фрагмента ДНК, содержащего гены триптофансинтетазы А и антранилатсинтетазы *E. coli*, приводит к повышению уровня активности данных ферментов в клетке соответственно в 40 и 18 раз по сравнению со штаммом дикого типа: копийность гибридной плазмиды при этом составила примерно 25 молекул на клетку. Клонированием в плазмиде pMB9 фрагмента ДНК, содержащего ген *sbc*B^+, достигнуто 25-кратное увеличение в *E. coli* уровня активности экзонуклеазы I. При встройке в тот же вектор фрагментов хромосомы *E. coli*, содержащих гены *dna*B, *dna*C, *dna*E и *dna*Z, за счет повышенной копийности увеличена продукция соответствующих белков в 3–10 раз.

При клонировании бактериальных генов в таких векторных плазмидах, как pBR322, pBR325 и pBR327, уровень синтеза белков возрастает в 25–100 раз. По-видимому, это обусловлено тем, что данные плазмиды имеют бóльшую копийность в *E. coli*, чем ColE1. Интерес-

ным свойством этого класса плазмид является то, что в присутствии ингибитора белкового синтеза — хлорамфеникола копийность их может увеличиваться до $3 \cdot 10^3$ молекул на клетку (около половины суммарной клеточной ДНК). Однако достичь пропорционального увеличения продукции кодируемого клонированным геном белка не удается, так как обработка хлорамфениколом ингибирует белковый синтез в клетках. После удаления хлорамфеникола из среды белковый синтез и деление клеток возобновляются и копийность гибридной плазмиды постепенно снижается.

Я. Фукумаки с сотрудниками, встроив в плазмиду ColE1 ген *gua*A *E. coli* и введя гибридную плазмиду в клетки *E. coli*, добились возрастания ферментативной активности ксантозин-5′-монофосфатаминазы (продукта гена *gua*A) в 4,4 раза. Копийность гибридной плазмиды в этом случае составила 4,6 молекул на клетку. После шестичасовой обработки хлорамфениколом клеток, содержащих гибридную плазмиду, и удаления из среды антибиотика удалось зарегистрировать увеличение активности фермента еще в 8,4 раза. Копийность плазмиды в этот момент составляла 15 молекул на клетку. Более длительная обработка штамма хлорамфениколом приводила к необратимым негативным изменениям клеток.

В другом исследовании, выполненном в лаборатории С. Н. Щелкунова (1982 г.), в векторную плазмиду pBR322 встроили *Bam*HI-фрагмент ДНК фага λp*lac*5 *L8UV5*, содержащий ген β-галактозидазы *E. coli*. Полученная гибридная плазмида pKB56B1 обеспечивала в клетках *E. coli* продукцию β-галактозидазы, уровень которой в 8 раз превышал таковой для штамма *E. coli*, конститутивного по синтезу данного фермента. После двухчасовой обработки хлорамфениколом клеток *E. coli*, несущих плазмиду pKB56B1, и удаления антибиотика из среды достигалось трехкратное увеличение активности β-галактозидазы по сравнению с этим же штаммом, не обработанным хлорамфениколом. При более продолжительном воздействии хлорамфеникола на *E. coli*[pKB56B1] синтез β-галактозидазы уменьшался.

В аналогичной работе М. Робинсона с соавторами (1983 г.) при использовании плазмиды ColE1, несущей ген цитратсинтетазы *E. coli*, обработка плазмидосодержащих клеток хлорамфениколом привела к увеличению синтеза фермента лишь в 2,7 раза, хотя плазмида была амплифицирована в 20–40 раз. Такое несоответствие объясняется тем, что после снятия ингибирующего эффекта хлорамфеникола копийность плазмиды быстро снижается.

Для достижения в *E. coli* повышенной копийности клонируемых генов и сверхсинтеза кодируемых ими белков более перспективно использовать плазмиды, имеющие термочувствительные мутации по функции репликации. Первые успешные исследования в этом направлении выполнили Б. Юхлин с соавторами в 1979 г. На основе термочувствительного мутанта фактора устойчивости к антибиотикам R1 они получили мини-плазмиды pKN402 и pKN410 (см. рис. 2.11), обладающие способностью к безудержной репликации при температуре выше 35 °С. В результате амплификации в течение 2–3 ч количество плазмидной ДНК может достигнуть 75 % суммарной ДНК клетки. При этом синтез белка не ингибируется, что приводит к сверхпродукции белков, детерминируемых генами плазмиды. Например, клонированные гены хромосомной и плазмидной β-лактамазы в условиях такой термоиндукции давали увеличенный в 300–400 раз выход фермента. Создан широкий спектр векторных производных pKN402, которые после термоиндукции за счет значительного увеличения дозы клонированного гена обеспечивают сверхсинтез кодируемого этим геном белка.

Изучение механизма регуляции репликации фактора R1 привело Дж. Ларсена с соавторами (1984 г.) к созданию нового типа векторных плазмид серии pOU. Поскольку интенсивность репликации плазмиды R1 находится в прямой зависимости от уровня синтеза белкового продукта плазмидного гена *rep*A, авторы сконструировали гибридные плазмиды, у которых в непосредственной близости от гена *rep*A встроен фрагмент ДНК фага λ, содержащий ген cI_{857} и промотор p_R, направленный в сторону гена *rep*A. При температуре ниже 35 °С в клетке находится примерно 1 молекула плазмиды серии pOU. При температуре 42 °С в результате инактивации термочувствительного репрессора cI_{857} происходит дерепрессия промотора p_R, приводящая к конститутивной неконтролируемой репликации плазмиды. Уже через 1–2 ч после термоиндукции плазмидная ДНК составляет половину всей ДНК клетки (более 1000 копий на клетку). Параллельно с амплификацией плазмиды происходит и сверхсинтез кодируемых ею белков.

Схожими с рассмотренными плазмидами свойствами обладает термоиндуцируемая векторная плазмида pKC16, сконструированная путем встройки в плазмиду pBR322 фрагмента

ДНК фага λcI_{857}, содержащего гены от *N* до *P* (рис. 3.1). Наличие в клонированном фрагменте области начала репликации фаговой ДНК, генов *O* и *P*, а также гена cI_{857}, кодирующего термочувствительный репрессор, позволяет при повышении температуры до 42 °С инициировать репликацию плазмиды pKC16 на фрагменте ДНК фага λ, что приводит к увеличению копийности этой плазмиды до 130 и более молекул ДНК на бактериальную хромосому. Возможность использования этой плазмиды для суперпродукции белков, кодируемых клонированными генами, продемонстрирована при встройке в pKC16 гена *xth E. coli*, кодирующего экзонуклеазу III. Термоиндукция репликации гибридной плазмиды приводит к 125-кратному увеличению в клетках активности экзонуклеазы III по сравнению со штаммом *E. coli* дикого типа по этому гену.

Особенностью рассмотренных термоиндуцируемых плазмид является то, что в результате их интенсивной репликации клетки *E. coli* погибают. Однако это обычно не имеет особого значения, так как после индукции нас прежде всего интересует продукт клонированного гена, а не жизнеспособность клетки.

Как видим, плазмиды обеспечивают широкие возможности для повышения дозы клонируемых в их составе чужеродных генов, а следовательно, и для увеличения продукции соответствующего белка.

Повышенную копийность клонируемых генов обеспечивают также векторы на основе ДНК фагов. Наиболее подробно в этом отношении изучен фаг λ. При литическом развитии он образует 100–200 фаговых частиц на клетку. Однако из-за лизиса клеток клонированный ген может экспрессироваться лишь в течение ограниченного времени. Чтобы снять данное ограничение, в геном фага λ вводят мутации по гену *S*, который контролирует лизис клеточной стенки. Мутантный фаг λS^- не способен лизировать клеточную стенку, и при его развитии в непермиссивных клетках наблюдается образование до 10^3 фаговых частиц на клетку. Однако пропорционального увеличения продукции белка клонированного гена в этом случае не будет, так как синтезируемые фаговые геномы упаковываются в капсиды. Избежать упаковки ДНК фага λ в белковый чехол можно введением мутаций по гену *Q*, который контролирует выражение поздних генов фага, ответственных за синтез его структурных белков, а также функции лизиса клеток и упаковки фаговой ДНК (см. 2.2.2). Поэтому мутанты λQ^-S^-, а также λQ^- в непер-

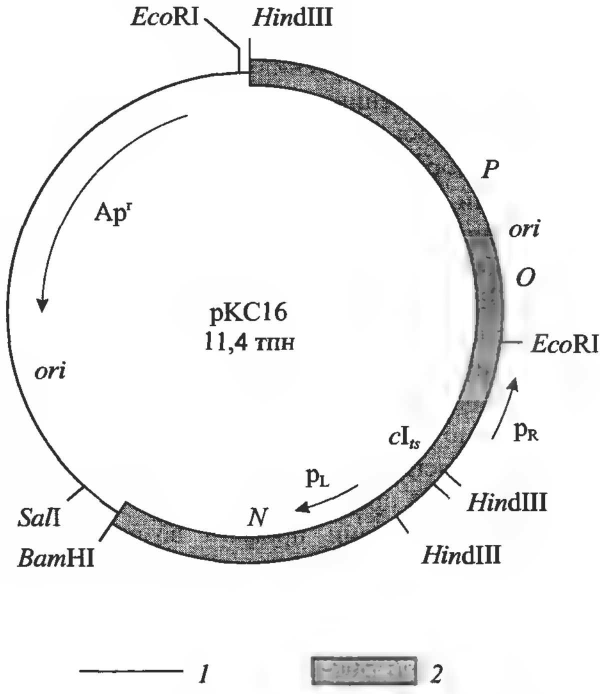


Рис. 3.1. Искусственная плазмида с термочувствительной индукцией амплификации: *1* — pBR322; *2* — ДНК фага λ

миссивных клетках фактически являются высококопийными плазмидами. Клетки *E. coli*, инфицированные такими мутантными фагами λ, содержат по крайней мере в 25 раз больше транскрибируемых геномов, чем клетки, инфицированные мутантами λS^-.

Фаги, мутантные по гену *N*, из-за неполной терминации транскрипции на t_{R1} способны, хотя и на низком уровне, экспрессировать гены *O* и *P*, что приводит к репликации фаговой ДНК. Такие фаги полностью дефектны по большинству ранних и по поздним функциям (в результате терминации транскрипции на t_{R2}), и поэтому при инфекции непермиссивных клеток фаг развивается как плазмида, которая обеспечивает высокую дозу гена и не лизирует бактериальные клетки. Как видим, для фага λ существуют два альтернативных варианта, позволяющих предотвратить лизис клеток и обеспечить высокую копийность клонированных в составе фагового генома чужеродных генов.

В ряде экспериментальных работ были использованы рассмотренные подходы к достижению повышенной дозы генов, трансдуцируемых фагом λ. В 1975 г. сотрудниками лаборатории Р. Дэвиса в состав ДНК векторного фага λgt-λB был встроен фрагмент хромосомной ДНК *E. coli*, содержащий ген ДНК-лигазы с мутацией *lop*-11, которая обеспечивает суперпродукцию этого фермента. Инфекция клеток

E. coli полученным гибридным фагом привела к 10-кратному увеличению активности ДНК-лигазы по сравнению с клетками дикого типа (lig^+). Оказалось, что лигазный ген функционирует в гибриде в любой из двух возможных ориентаций, что указывает на автономную транскрипцию клонированного гена под контролем собственного промотора. Затем фрагмент с геном ДНК-лигазы был перестроен в лизогенизирующий вектор λgt4. При индукции из лизогена гибридный фаг λgt4-*lop*-11lig^+ давал 100-кратное повышение уровня активности фермента по сравнению с клетками lig^+. В результате введения в геном гибридного фага мутации по гену *S* продукция ДНК-лигазы в клетках после индукции профага возросла еще в 5 раз. Таким образом, за счет повышенной копийности гена *lop*-11lig^+, клонированного в составе векторного фага λ, удалось достичь в клетках *E. coli* 500-кратного увеличения активности ДНК-лигазы по сравнению с клетками *E. coli* дикого типа или 100-кратного по сравнению с клетками *E. coli lop*-11lig^+.

Высокий уровень генных продуктов триптофанового оперона *E. coli* был выявлен при инфекции клеток фагами λ$trpQ^-S^-$, λ$trpQ^-$ или λ$trpN^-$. При этом пять ферментов *trp*-оперона составили около 50 % всех растворимых белков инфицированных клеток.

Эффект дозы гена был продемонстрирован также в лаборатории Н. Муррея при инфекции клеток сконструированными *in vitro* гибридными фагами λ*pol*A, несущими в составе гибридной молекулы ДНК ген ДНК-полимеразы I *E. coli*. При индукции из лизогенного состояния профага λ*pol*A уровень активности этого фермента возрастал в 30–50 раз, а при индукции профага λ*pol*A $Q_{am}S_{am}$ — в 75–100 раз по сравнению с нелизогенным Pol^+-штаммом.

Рассмотренные примеры показывают, что, используя мутанты фага λ, обеспечивающие повышенную копийность фагового генома и предотвращающие упаковку этого генома в белковый капсид, можно достигать высокой дозы клонируемого гена, а следовательно, значительного увеличения синтеза белка, детерминируемого этим геном.

Несомненный интерес представляют также векторы на основе ДНК нитевидных фагов. Эти фаги при инфекции не лизируют клетки *E. coli*, обеспечивая высокую копийность клонированного гена и высокий выход кодируемого им белка.

Таким образом, применение многокопийных векторов позволяет во многих случаях иметь в клетке очень высокий уровень белковых продуктов клонированных генов. Именно поэтому некоторые сегменты ДНК не могут быть клонированы в таких векторах, поскольку детерминируемые ими белки при повышенной продукции вносят значительные нарушения в физиологию бактериальной клетки. Обычно эти гены удается клонировать в низкокопийных векторных ДНК, например в плазмиде pSC101 и ее производных, или в многокопийных векторах экспрессии со строгим регулированием транскрипции. В последнем случае необходимо клонировать не весь ген, а только его кодирующую часть.

3.2. ВЛИЯНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСКРИПЦИИ КЛОНИРОВАННЫХ ГЕНОВ НА УРОВЕНЬ ИХ ЭКСПРЕССИИ

На уровень продукции белка, детерминируемого клонированным геном, большое влияние оказывает эффективность транскрипции кодирующей последовательности этого гена. Транскрипция ДНК осуществляется ферментом РНК-полимеразой. В клетке *E. coli* находится около 3 тыс. молекул этого фермента. РНК-полимераза *E. coli* является сложным белком, состоящим из нескольких разных субъединиц: β' (156 кДа), β (151 кДа), α (37 кДа) и σ (молекулярная масса различна для разных типов σ-субъединиц). Субъединицы в молекуле фермента агрегированы без образования ковалентных связей. Наименее прочно в этом комплексе связана σ-субъединица. Специфической ферментативной активностью обладает так называемый ***кор-фермент*** (от англ. core — сердцевина), имеющий формулу $\beta'\beta\alpha_2$. Эту форму РНК-полимеразы обозначают буквой Е (от англ. enzyme — фермент). В свободном состоянии кор-фермент не является полноценной РНК-полимеразой, так как не способен правильно узнавать на ДНК сигналы инициации транскрипции генов. При объединении σ-субъединицы с кор-ферментом формируется ***холофермент*** (Еσ), имеющий формулу $\beta'\beta\alpha_2\sigma$. σ-Субъединица, или ***σ-фактор***, обеспечивает специфичность связывания холофермента с определенными участками ДНК. Последовательности ДНК, на которых происходит первичное связывание Еσ и ини-

циация данным ферментом синтеза нити РНК, комплементарной одной из цепей ДНК, называются ***промоторами***.

Подавляющее большинство генов бактерии *E. coli* транскрибируется холоферментом РНК-полимеразы, содержащим фактор σ^{70} (цифра обозначает молекулярную массу σ-фактора в кДа). При сравнении большого числа промоторов разных генов *E. coli* оказалось, что их последовательности существенно отличаются друг от друга. В то же время выявляются две короткие высококонсервативные области, одна из которых локализована на расстоянии около 10 пн (–10 область), а другая — около 35 пн (–35 область) от точки инициации транскрипции (+1):

–35 –10
...TTGACA...TATAAT...

(Здесь и далее при рассмотрении промоторов для наглядности оперируют цепью ДНК, которая соответствует по последовательности матричной РНК, но в действительности является комплементарной той цепи ДНК, которая транскрибируется.) Выявленные консервативные последовательности промоторов представляют собой участки контакта холофермента с ДНК. Несимметричностью последовательности промотора обеспечивается однозначный выбор ферментом направления транскрипции.

Немногочисленные гены теплового шока *E. coli* транскрибируются холоферментом, содержащим фактор σ^{32}. Такой фермент узнает промоторы, отличающиеся по последовательности от обычных:

–35 –10
...CTTGAA...CCCCATTA...

Другие σ-факторы (например синтезируемые некоторыми фагами) также существенно изменяют специфичность РНК-полимеразы *E. coli* к промоторным последовательностям.

Наиболее хорошо изучено взаимодействие с промоторами холофермента, содержащего σ^{70}. РНК-полимераза закрывает собой участок ДНК длиной около 60 пн и на промоторе одновременно взаимодействует с районами –35 и –10. После связывания фермента с ДНК происходит локальное расплетение цепей, что дает возможность ферменту начать синтез нити РНК на соответствующем одноцепочечном участке ДНК. После того как начинается ***элонгация*** (наращивание) цепи РНК, σ-фактор высвобождается из комплекса, в состав которого входят РНК-полимераза, ДНК и синтезируемая цепь РНК. Освободившись, σ-фактор может снова присоединиться к другой молекуле кор-фермента.

Показано, что $E\sigma^{70}$ не требует строгого сохранения последовательностей районов –35 и –10, и поэтому данный основной вариант РНК-полимеразы *E. coli* взаимодействует с большим количеством различных промоторов и промотороподобных участков на молекулах ДНК. Разные промоторы функционируют с различной эффективностью. Так называемые сильные (эффективные) промоторы инициируют транскрипцию с высокой частотой. Именно такими промоторами обычно предпочитают манипулировать при проведении генно-инженерных экспериментов. На силу промотора существенно влияют последовательности областей –35 и –10, а также расстояние между ними. Например, выявлена мутация *UV5*, которая усиливает транскрипцию с промотора лактозного оперона. Секвенирование показало, что мутация затрагивает область –10 промотора и эта область, имеющая в промоторе дикого типа p_{lac} структуру TATGTT, в p_{lacUV5} изменена так, что соответствует наиболее часто встречающейся последовательности TATAAT (рис. 3.2).

Последовательности, окружающие относительно высококонсервативные районы –35 и –10, также влияют на силу промотора. Однако закономерности этого влияния пока не определены, и поэтому по последовательности нуклеотидов эффективность промотора оценить невозможно. Каждый промотор индивидуален, и его применимость для решения тех или иных задач может быть оценена лишь экспериментально.

Кроме сигналов, обеспечивающих начало синтеза нитей РНК, существуют также и сигналы окончания (терминации) транскрипции в определенных точках ДНК-матрицы. Обязательным элементом ***терминатора*** транскрипции является палиндромная последовательность (инвертированный повтор), которая на молекуле РНК формирует двухцепочечную шпильку (рис. 3.3). У *E. coli* существует два типа терминаторов — ρ-независимые и ρ-зависимые. У ρ-независимых терминаторов шпилька на 3′-конце молекулы РНК, как правило, является GC-богатой, а за ней идет последовательность олиго(rU). Любые шпильки, возникающие в синтезирующейся РНК, по-видимому, заставляют полимеразу двигаться медленнее или останавливаться. На ρ-независимых терминаторах полимераза отделяется от ДНК-матрицы и высвобождает РНК. Последовательность из остатков U, расположенная сразу же за шпилькой, при-

	–35 TTGACA / –10 TATAAT
p_{trp}	AAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGAACTAG TTAACTAGTACGC
(p_{tac})	AAATGAGCTGTTGACAATTAATCAT CGGCTCG TATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTC
p_{lacUV5}	CACCCCAGGCTTTACACTTTCTGCTTCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTC
(p_{pac})	AAAAATTTATTTGCTTTCAGGAAAATTTTTCT GTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTC
P25 T5	AAAAATTTATTTGCTTTCAGGAAAATTTTTCTG TATAATAGATTCA
p_{lac}	CACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTC
(p_{rac})	AAATAAATGCTTGACTCTGTAGCGGGAAGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTC
p_2 *rrn*B	AAATAAATGCTTGACTCTGTAGCGGGAAGGCG TATTATGCACACC

Рис. 3.2. Последовательность нуклеотидов природных и гибридных (обведены) промоторов. Сплошная линия — области промоторов –35 и –10; штриховая линия — оператор лактозного оперона

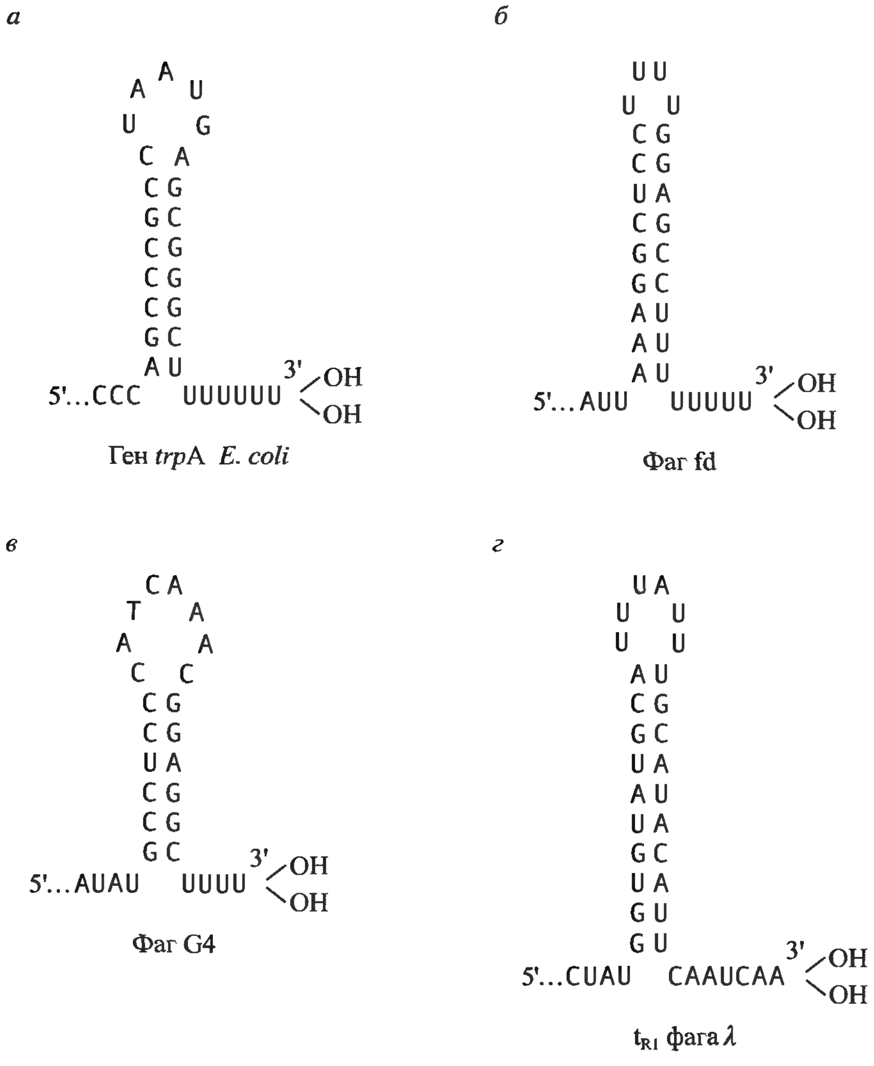


Рис. 3.3. Структура 3′-концевых терминаторных участков различных мРНК в клетках *E. coli*: *а–в* — ρ-независимые, *г* — ρ-зависимый терминатор

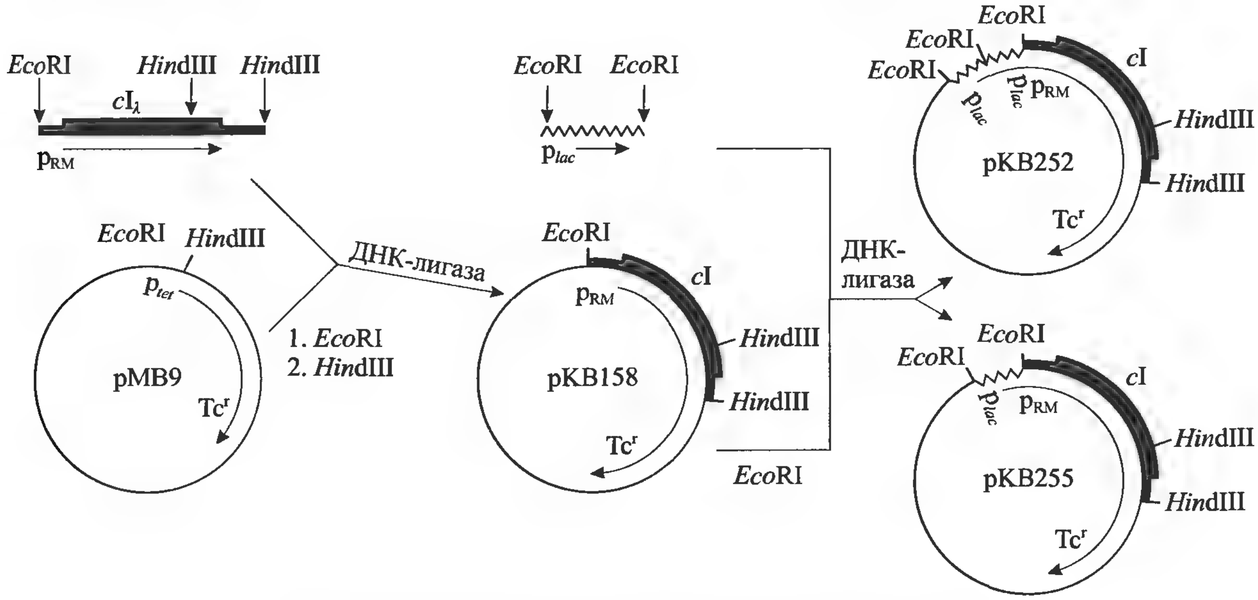


Рис. 3.4. Схема конструирования гибридных плазмид серии pKB

нимает участие в этом процессе. Комплекс РНК–ДНК (rU–dA) характеризуется необычайно слабыми комплементарными взаимодействиями. Поэтому достаточно минимального количества энергии, чтобы разрушить связи, удерживающие вместе две цепи. Таким образом, остановка РНК-полимеразы в области шпильки в ρ-независимом терминаторе создает благоприятные условия для высвобождения РНК из комплекса rU–dA.

Терминация транскрипции обычно происходит не на строго определенном нуклеотиде, а на любом из нескольких остатков, расположенных ближе к 3′-концу U-участка. Олиго(rU)-последовательность из нуклеотидов U на 3′-конце РНК соответствует АТ-богатой области в молекуле ДНК-матрицы. Как видим, АТ-богатые участки ДНК играют важную роль не только в инициации, но и в терминации транскрипции. Каждый терминатор характеризуется определенной эффективностью, которая оценивается как доля цепей РНК, терминация которых на нем произошла. Эффективность терминаторов транскрипции может варьировать в широких пределах, но важно подчеркнуть, что терминаторов, обеспечивающих 100%-ное прекращение синтеза РНК у *E. coli*, не выявлено.

У ρ-зависимых терминаторов в шпильке обычно ниже относительное содержание GC-пар и, кроме того, отсутствует олиго(rU)-участок (см. рис. 3.3). Фактор ρ представляет собой белок с молекулярной массой 55 кДа. Активной формой, по-видимому, является тетрамер. Полагают, что фактор ρ связывается с 5′-концом синтезирующейся молекулы РНК и движется вдоль нее. Когда РНК-полимераза останавливается на некоторое время в районе шпильки, фактор ρ может ее догнать и в результате взаимодействия с ней вызвать распад комплекса. Эффективность ρ-зависимого терминатора определяется стабильностью шпильки, формируемой молекулой РНК, и временем задержки на ней РНК-полимеразы. Сопряженная с транскрипцией трансляция вновь синтезированной мРНК, которая часто наблюдается у бактерий (см. рис. 3.6), может препятствовать ρ-зависимой терминации, так как в этом случае на молекуле РНК находятся рибосомы, мешающие продвижению по ней фактора ρ.

Многие гены *E. coli* контролируются относительно слабыми промоторами. Экспрессию таких генов можно увеличить, поместив их под контроль сильных промоторов *E. coli* (p_{lacUV5}, p_{trp}, p_{lpp}, p_{bla}) или фагов (λp_L, λp_R, T5p_{25} и др.).

Так, Д. Стеффен и Р. Шлейф в одной из ранних работ (1977 г.) показали, что трансформация *E. coli* плазмидой pMB9, несущей ген *ara*C *E. coli*, приводит к 4-кратному увеличению синтеза белка AraC в клетках. Если же этот ген дополнительно поместить под контроль промотора p_{lacUV5}, то продукция белка возрастает уже в 50 раз.

При встройке в плазмиду pMB9 фрагмента ДНК фага λ, содержащего ген *c*I (гибридная плазмида pKB158, рис. 3.4), М. Пташне с сотрудниками получили увеличение продукции фагового репрессора cI в 5 раз по сравнению с уровнем данного белка в штамме, являющемся лизогеном по фагу λ. При этом транскрипция

клонированного гена *c*I осуществлялась с фагового промотора p_{RM}. Когда к гену *c*I в pKB158 подстроили фрагмент ДНК, содержащий промотор p_{lacUV5} (плазмида pKB255, см. рис. 3.4), продукция белка-репрессора возросла по сравнению с лизогеном в 15 раз, а при встройке тандема этих промоторов (плазмида pKB252) — в 35 раз.

Иногда для экспрессии чужеродных генов в *E. coli* необходимо использовать сильные промоторы, функционирование которых подвергается регуляции. Прежде всего это требуется в тех случаях, когда продукт клонированного гена токсичен для клеток *E. coli*. При этом клетки можно культивировать до определенного момента в условиях, когда транскрипция клонированного гена репрессирована, а затем индуцировать эффективную транскрипцию. Такой подход позволяет вырастить клетки, содержащие гибридные ДНК, до достаточно высокого титра и лишь после этого инициировать продукцию белка, сверхсинтез которого приводит к гибели бактериальных клеток. Кроме того, известно, что интенсивная транскрипция, направляемая сильным промотором, может отрицательно сказываться на эффективности репликации плазмидной ДНК, а это приводит к нестабильности поддержания плазмиды и постепенной ее элиминации из бактериальных клеток. Такие плазмиды могут быть стабилизированы, если дистально от сильного промотора встроить эффективные сигналы терминации транскрипции.

В одной из первых работ по использованию индуцируемых промоторов в векторную плазмиду — производную pBR322, содержащую в своем составе сильный промотор p_L фага λ, встроили ген *trp*A. Гибридную плазмиду ввели в лизогенные клетки *E. coli*, в которых синтезируется термочувствительный репрессор фага λ. При температуре 30 °С продукция триптофансинтетазы А практически не увеличилась. Однако после термической инактивации репрессора начинает функционировать промотор p_L, который при температуре 37 °С направляет сверхсинтез триптофансинтетазы, и выявляемый уровень активности этого фермента возрастает в 30–50 раз.

Термоиндуцируемые сильные промоторы типа λp_L, по-видимому, перспективны для конструирования технологичных штаммов-продуцентов различных полипептидов. В настоящее время получен ряд векторных плазмид, содержащих термоиндуцируемый промотор p_L фага λ, и показано, что с их помощью можно добиваться продукции в *E. coli* различных белков, превышающей нормальный уровень в десятки раз.

Можно также применять промоторы, индуцируемые низкомолекулярными соединениями. Так, в плазмиду pBR322 был встроен фрагмент ДНК, содержащий промотор триптофанового оперона, ген *trp*E и часть гена *trp*D. После индукции транскрипции с клонированного промотора 3-β-индолилакриловой кислотой (ИАК) уровень продукции антранилатсинтетазы, кодируемой геном *trp*E, возрастал в 50 раз, составляя при этом 55 % вновь синтезированного белка клетки. Если для контроля транскрипции клонированной последовательности ДНК используется промотор гена β-галактозидазы, то эффективную транскрипцию с него можно инициировать, снимая репрессию введением в среду изопропил-β-*D*-тиогалактозида (ИПТГ) — специфичного индуктора лактозного оперона *E. coli*.

Исходя из того, что промотор p_{lacUV5} имеет «идеальную» область –10, а p_{trp} — область –35, Х. Де Бойер с соавторами в 1982 г. сконструировали гибридный промотор, названный ими p_{tac} (см. рис. 3.2). Данный искусственный промотор репрессируется *lac*-репрессором, и транскрипция с него может быть индуцирована ИПТГ. В составе векторной плазмиды p_{tac} в 5–10 раз эффективнее, чем p_{lacUV5}.

Известно, что промоторы ранних генов *P*25 и *P*26 фага Т5 имеют высокую аффинность к РНК-полимеразе *E. coli* и являются очень сильными конститутивными промоторами. Чтобы сделать промотор гена *P*25 регулируемым, Т. Шибуи с сотрудниками (1988 г.) с помощью химического синтеза олигонуклеотидов и клонирования создали промотор p_{pac} (см. рис. 3.2). Данный промотор подвергается регуляции, как промотор *lac*-оперона, и при этом эффективно функционирует: при индукции ИПТГ он направляет экспрессию встроенного гена в 3 раза эффективнее, чем p_{tac}. В векторные плазмиды с такими сильными промоторами необходимо вводить эффективно функционирующие терминаторы транскрипции, чтобы процесс считывания мРНК со встроенного в вектор гена не интерферировал с другими функциями плазмиды.

По аналогичной схеме И. Борос с соавторами (1986 г.) создали регулируемый промотор p_{rac}, включающий область –35 сильного промотора p_2 гена рибосомной РНК *rrn*B и область –10 промотора *lac*-оперона дикого типа (см. рис. 3.2). Синтез чужеродного белка, обеспечиваемый после индукции данного промотора, в некоторых случаях достигает уровня 60 % суммарного клеточного белка *E. coli*.

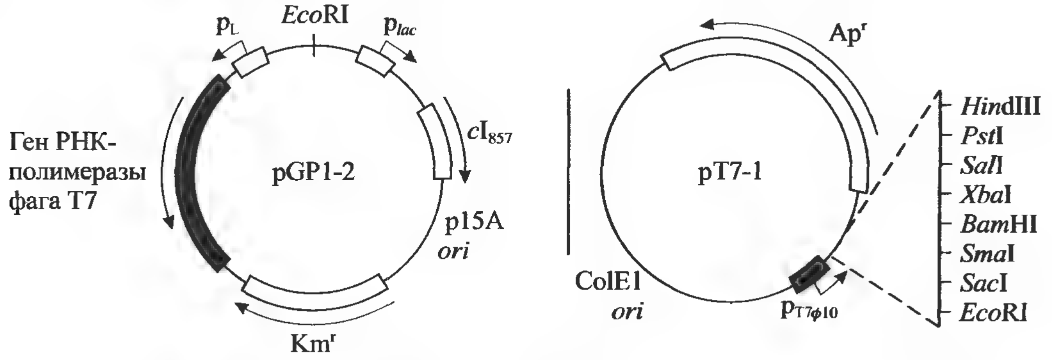


Рис. 3.5. Парная система экспрессии РНК-полимераза фага Т7 – поздний промотор $\phi10$ фага Т7. Генетические элементы фага Т7 находятся в двух репликонах на основе совместимых плазмид P15A и ColE1

Необходимо отметить, что рассмотренные варианты индуцируемой транскрипции имеют определенные недостатки. Так, при повышении температуры среды индуцируется экспрессия не только целевого гена, но и ряда генов клетки-хозяина, в том числе и генов протеаз. Использование химических индукторов, как правило, ограничивается лишь лабораторным масштабом, так как удорожает биотехнологический процесс.

Существует подход, лишенный этих недостатков. Известно, что многие фаги *E. coli* кодируют РНК-полимеразы, способные взаимодействовать лишь со специфическими промоторами поздних фаговых генов. Наиболее хорошо изучена РНК-полимераза фага Т7. В противоположность многосубъединичным РНК-полимеразам бактерий и эукариот, она является мономерным белком (как и аналогичные ферменты других фагов) с молекулярной массой 99 кДа. В отличие от фермента клетки-хозяина РНК-полимераза Т7 узнает строго специфическую непрерывную последовательность размером 23 пн, прилегающую к точке инициации транскрипции. Скорость элонгации РНК-полимеразой Т7 в 5 раз выше, чем ферментом *E. coli*.

В 1985 г. С. Тэбор и К. Ричардсон предложили использовать РНК-полимеразу фага Т7 для суперэкспрессии целевых генов. Экспериментально было доказано, что на ДНК *E. coli* промоторы для РНК-полимеразы Т7 отсутствуют. При инфицировании *E. coli* фагом Т7 фагоспецифичная РНК-полимераза составляет 0,1 % клеточного белка. Ген этого фермента (обозначаемый цифрой *1*) является ранним и транскрибируется РНК-полимеразой клетки-хозяина. После встройки гена *1* фага Т7 в векторную плазмиду уровень продукции фаговой РНК-полимеразы в *E. coli* возрастает в десятки раз, однако это не сказывается на скорости роста бактериальных клеток. Введение же в эти клетки другой совместимой плазмиды, содержащей промотор фага Т7, вызывает летальный для бактерии эффект, так как мощная транскрипция полимеразой фага с этого промотора приводит к фактическому изъятию пула рибонуклеозидтрифосфатов клетки. Транскрипция идет столь эффективно, что происходит многократное считывание ферментом полного плазмидного генома. Терминаторы транскрипции *E. coli* практически не узнаются РНК-полимеразой Т7. Поэтому в плазмиду экспрессии необходимо вводить специфический для Т7 терминатор транскрипции.

Первый вариант системы экспрессии, зависимой от РНК-полимеразы фага Т7, представлен на рис. 3.5. Ген *1* фага Т7 в плазмиде pGP1-2 помещен под контроль промотора p_L фага λ и при температуре 30 °С находится в репрессированном состоянии за счет воздействия белка-репрессора cI фага λ. При нагревании бактериальной культуры выше 37 °С происходит инактивация термочувствительного фагового репрессора и индуцируется экспрессия гена фага Т7. Синтезируемая РНК-полимераза фага Т7 интенсивно транскрибирует последовательность ДНК, находящуюся во второй плазмиде (pT7-1) под контролем промотора $p_{T7\phi10}$, и уровень белка данного целевого гена может составить 30–50 % суммарного клеточного белка. Недостатком рассмотренной системы экспрессии является то, что промотор p_L репрессируется белком cI_{857} не полностью и при температуре 30 °С имеется определенный фоновый синтез РНК-полимеразы Т7, которого достаточно для активной экспрессии гена, встроенного в pT7-1. Если продукт изучаемого гена токсичен для *E. coli*, то и без индукции будет происходить гибель бактериальных клеток. Это лишний раз подтверждает, насколько данная система экспрессии генов эффективна.

Чтобы преодолеть указанные затруднения, предложен ряд модификаций системы экспрессии, зависимой от фага T7. Целевой ген вводится в клетки *E. coli* в составе плазмиды под контролем промотора фага T7. Данный промотор РНК-полимеразой клетки-хозяина не узнается, и изучаемый ген находится в строго репрессированном состоянии. После того как культура с гибридной плазмидой достигнет определенной плотности, ее можно заразить фагом T7 или гибридными фагами λ либо M13, несущими ген РНК-полимеразы T7. В первых двух случаях клетки спустя некоторое время будут лизироваться. В последнем — лизиса клеток не наблюдается. При инфекции фагом λ лизиса клеток также можно избежать, если ввести в вектор мутации по генам *Q* и *S* (см. 2.2.2). Кроме того, в качестве клетки-хозяина можно использовать *E. coli*, лизогенную по гибридному фагу λ, несущему ген РНК-полимеразы T7, и в нужный момент индуцировать его из состояния профага.

В ряде лабораторий были созданы векторные плазмиды экспрессии, у которых сильные промоторы тандемно повторены (для примера см. на рис. 3.4 плазмиду pKB252). Показано, что дупликация промоторов приводит к усилению транскрипции клонированных генов. Такой же эффект наблюдается и при комбинации двух различных промоторов. Поэтому данный подход к увеличению продукции целевого белка используют довольно часто.

В настоящее время существует широкий набор генетических конструкций, обеспечивающих высокоэффективную транскрипцию клонируемых генов.

Пока мало изучен вопрос о том, как эффективное выражение генов вектора, не участвующих в его репликации, влияет на уровень экспрессии клонированного чужеродного гена. По крайней мере, в одной из первых работ в этом направлении Н. Панаётатосом (1988 г.) было показано, что снижение уровня экспрессии гена устойчивости к антибиотику (*kan*R) многокопийной векторной плазмиды (за счет введения мутаций по промотору этого гена) приводит к двукратному увеличению продукции в *E. coli* фактора некроза опухоли человека, ген которого клонирован в этой плазмиде.

Другим фактором, который редко учитывают при оптимизации транскрипции клонируемых генов, является степень суперскрученности ДНК. В клетках *E. coli* контроль топологического состояния молекул ДНК осуществляется двумя топоизомеразами, имеющими противоположно направленное действие: ДНК-топоизомераза I расплетает (релаксирует) ДНК, в то время как ДНК-гираза суперскручивает ДНК. Используя те или иные мутанты *E. coli* по системе топоизомеризации ДНК, можно влиять на уровень экспрессии клонируемых генов.

Подводя итог данного раздела, можно сделать вывод, что встройка интенсивно транскрибируемых генов в многокопийные векторные ДНК вызывает, как правило, сверхпродукцию белков, кодируемых этими генами. Важно, чтобы 5′-концевая последовательность синтезируемой мРНК имела такую организацию, которая обеспечивала бы эффективную инициацию ее трансляции.

3.3. ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСЛЯЦИИ МАТРИЧНЫХ РНК

Молекулярные процессы синтеза белка являются достаточно сложными. В них участвуют три класса молекул РНК: матричная (мРНК), транспортная (тРНК) и рибосомная (рРНК). Синтез белка осуществляется крупным мультиферментным комплексом — рибосомой, построенной из молекул белков и РНК. Кроме того, существуют ферменты аминоацил-тРНК-синтетазы, факторы инициации (IF) синтеза полипептидных цепей и факторы освобождения (RF), участвующие в терминации трансляции.

Современный уровень знаний в молекулярной биологии и методология генетической инженерии позволяют воздействовать на процесс синтеза белка, лишь модифицируя структуру матричной РНК и не затрагивая весь основной комплекс макромолекул клетки, участвующих в трансляции. Поэтому более подробно рассмотрим структурную организацию мРНК *E. coli*.

Большинство бактериальных мРНК недолговечны. Функциональное время полужизни мРНК обычно составляет около 2 мин. У бактерий транскрипция и трансляция сопряжены. При температуре 37 °С транскрипция мРНК происходит со скоростью примерно 2500 нуклеотидов в 1 мин, что соответствует образованию 14 кодонов в 1 с. При этом известно, что в растущую полипептидную цепь за 1 с включается от 12 до 17 аминокислотных остатков.

Рибосомы в бактериальной клетке связываются с 5′-концевым районом мРНК и начинают ее трансляцию уже тогда, когда еще не закончена транскрипция матрицы (рис. 3.6). Необходи-

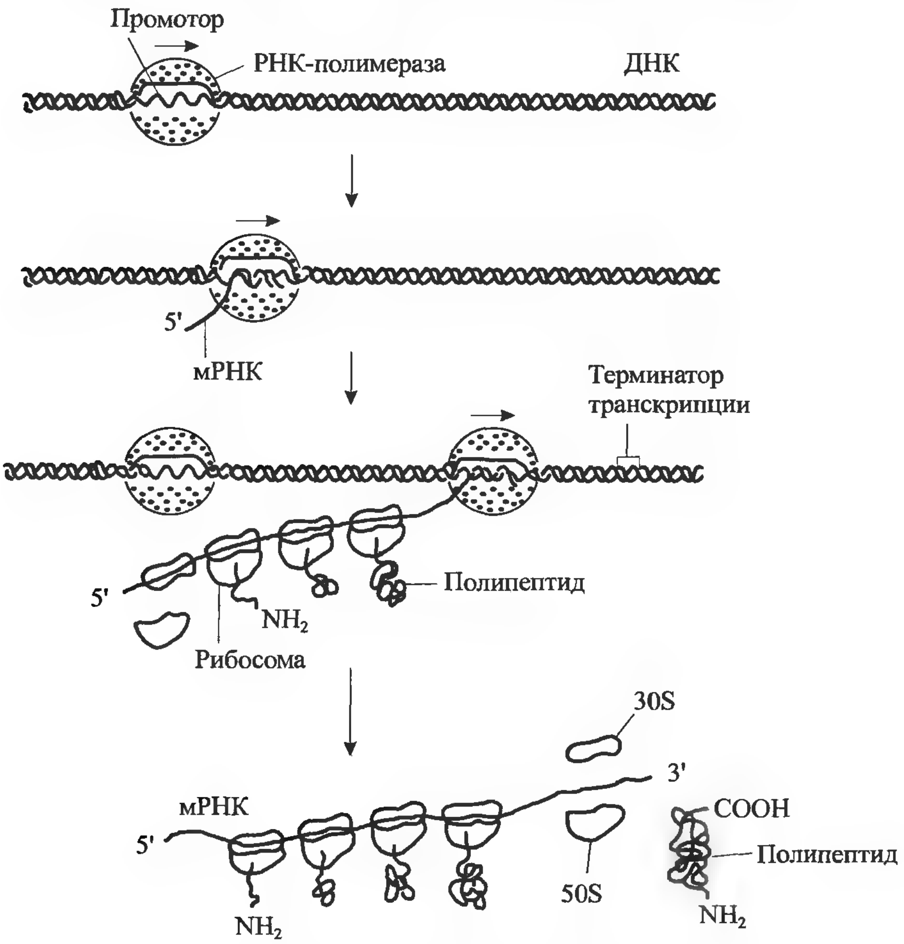


Рис. 3.6. Схема транскрипции и трансляции в клетках *E. coli*

мо отметить, что кодирующая белок последовательность мРНК ограничена на 5′- и 3′-концах некодирующими участками.

Интенсивность трансляции мРНК в бактериях зависит от ряда параметров. Относительно хорошо изучено влияние последовательности нуклеотидов и вторичной структуры 5′-концевой области мРНК на эффективность инициации трансляции в клетках *E. coli*. Первоначально с молекулой мРНК взаимодействует малая 30S-субъединица рибосомы, объединенная с тремя факторами инициации. В этот контакт вовлекается участок мРНК длиной около 35 нуклеотидов. Последовательность мРНК, с которой происходит такое первичное связывание, получила название ***участок связывания рибосом*** (ribosome binding site, RBS). Участок связывания рибосом обязательно содержит инициаторный кодон (AUG, реже GUG) и последовательность, комплементарную 3′-концевому району 16S рибосомной РНК

3′ AUUCCUCCACUAGGUUGGC...5′

Эту последовательность нуклеотидов обычно называют ***последовательностью Шайна–Дальгарно*** или ***SD-последовательностью*** (по фамилиям авторов, выявивших ее в 1975 г.). Связывание 30S-субъединицы рибосом с мРНК происходит, по-видимому, в результате взаимодействия комплементарных последовательностей нуклеотидов на 5′-концевом участке мРНК и 3′-конце 16S рРНК. Последовательность SD имеет размер от 3 до 9 нуклеотидов, при этом она не обязательно должна быть непрерывно комплементарной соответствующему участку 16S рРНК. Наиболее часто в качестве SD-участка на мРНК выявляют последовательность AGGAG.

Расстояние от SD-последовательности до инициаторного кодона у *E. coli* варьирует от 3 до 13 нуклеотидов (в большинстве случаев 5–9). Причем от этого расстояния может существенно зависеть эффективность инициации трансляции мРНК и в конечном счете — уровень экспрессии кодирующей последовательности изучаемого гена. На эффективность связывания рибосомы также влияет в целом вся последовательность района мРНК от –20 до +14 (за +1 принят первый нуклеотид инициаторного

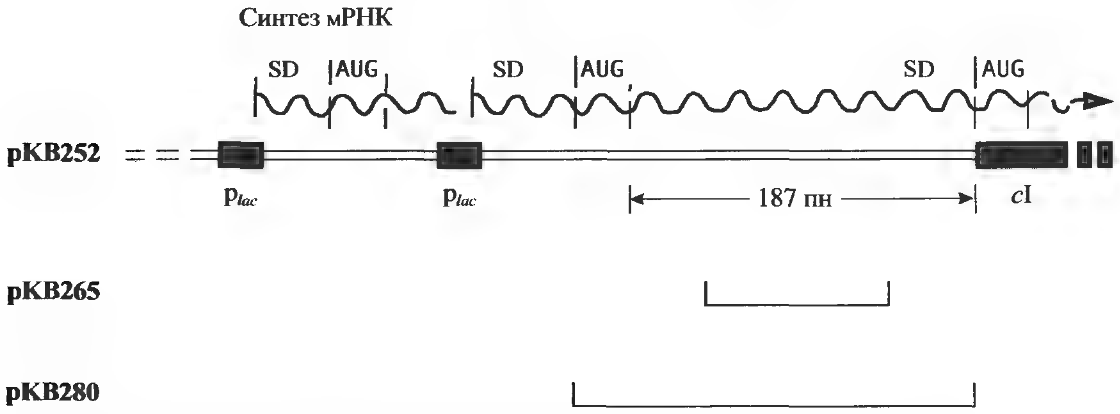


Рис. 3.7. Организация 5′-концевой части гена *c*I в гибридных плазмидах. Скобками указаны границы делеции

кодона), однако четких закономерностей этого влияния пока не обнаружено. Доказано, что наличие шпилечных (взаимокомплементарных) структур в 5′-концевой области мРНК, особенно в районе участка RBS, снижает эффективность инициации трансляции.

В процессе связывания 30S-субъединицы рибосом с участком RBS на мРНК происходит стерическое изменение этой субъединицы, обусловливающее эффективное взаимодействие ее с инициаторной формилметионил-тРНК (f-Met-тРНК). Вслед за этим к данному комплексу присоединяется 50S-субъединица рибосом, и сформировавшаяся полноценная рибосома (70S) осуществляет наращивание полипептидной цепи. На интенсивность трансляции мРНК в некоторых случаях может влиять и ее первичная структура, так как не все кодоны с одинаковой эффективностью вовлекаются в процесс.

Три кодона (UAA, UAG и UGA) на мРНК являются терминаторными: они останавливают трансляцию. С данными кодонами в составе рибосомы взаимодействует особый белок (фактор освобождения), который обеспечивает отделение карбоксильного конца растущей полипептидной цепи от молекулы тРНК, после чего полипептид освобождается, а рибосома распадается на две субъединицы.

В отличие от эукариотических бактериальные мРНК могут значительно различаться по числу кодируемых ими белков. Некоторые молекулы соответствуют только одному гену — это моноцистронные мРНК. Другие содержат последовательности, кодирующие несколько белков, — это полицистронные мРНК. Инициация трансляции в каждом цистроне в составе полицистронной мРНК, как правило, происходит независимо, т. е. каждый цистрон имеет собственный участок RBS. В некоторых генно-инженерных работах реализуется полицистронный принцип построения бактериальных мРНК при клонировании чужеродных генов (например, см. рис. 2.44).

Несмотря на большой прогресс в понимании процессов трансляции, пока ясны лишь основные структурно-функциональные закономерности организации мРНК. В частности, по последовательности нуклеотидов участка связывания рибосом практически невозможно *a priori* определить эффективность инициации трансляции рассматриваемой мРНК. Поэтому каждая изучаемая конструкция должна подвергаться экспериментальной проверке.

Целенаправленные исследования влияния структуры RBS на эффективность экспрессии клонированных генов выполнены в лаборатории М. Пташне (1978–1980 гг.). Первоначально изучалось влияние структуры гибридного участка связывания рибосом плазмиды pKB252 (см. рис. 3.4) и ее производных на уровень продукции в клетках *E. coli* белка cI — репрессора фага λ. В исходной плазмиде pKB252 ген *c*I фага λ состыкован с тандемно расположенными фрагментами, каждый из которых содержит промотор, SD-последовательность, инициирующий трансляцию кодон и последовательность, кодирующую первые семь аминокислот гена *lac*Z (рис. 3.7). Встроенный в pKB252 ген *c*I также имеет свой неповрежденный участок связывания рибосом. Поскольку рамка трансляции, начинающейся с кодона AUG гена β-галактозидазы, не совпадает с рамкой кодирующей последовательности гена *c*I, трансляция cI в плазмиде pKB252 зависит от собственной SD-последовательности. Это подтверждается и тем, что делеция в плазмиде pKB252 сегмента длиной 114 пн в области между SD-участками генов *lac*Z и *c*I (плазмида pKB265, см. рис. 3.7)

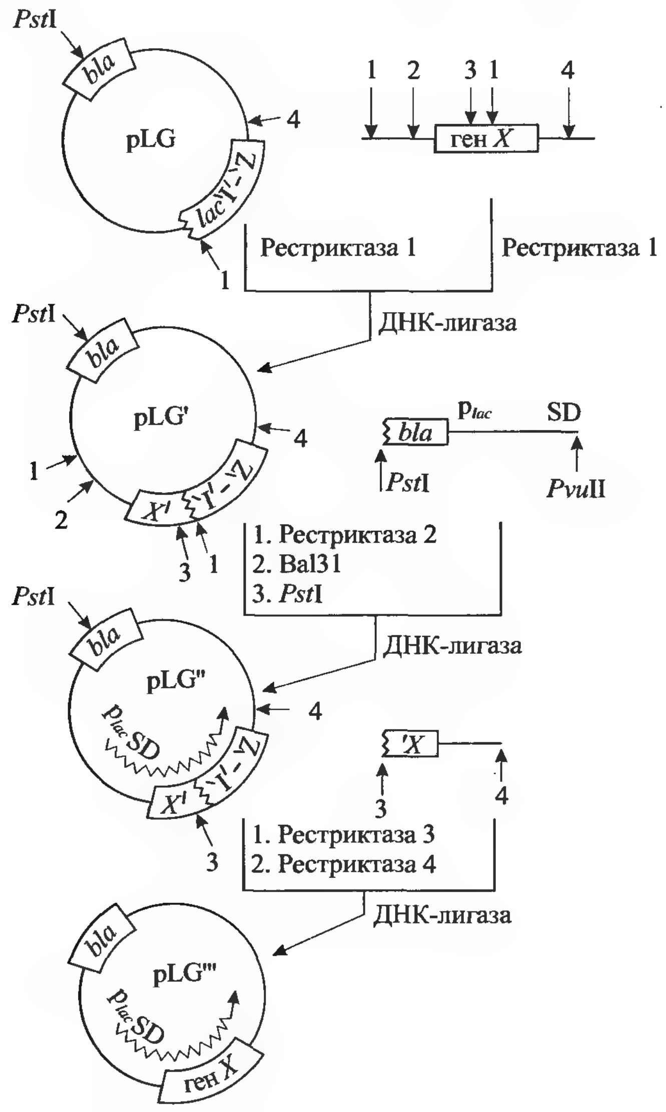


Рис. 3.8. Метод оптимизации трансляции гибридных генов

не влияет на уровень продукции фагового репрессора в клетках *E. coli*. Использование делеционного варианта плазмиды pKB252, в котором образован гибридный участок связывания рибосом, состоящий из SD-последовательности гена *lacZ* и инициаторного кодона гена *c*I (плазмида pKB280, см. рис. 3.7), приводит к увеличению синтеза белка-репрессора фага λ в 3–5 раз.

Эти результаты показывают, что последовательность нуклеотидов участка связывания рибосом может существенно влиять на эффективность трансляции структурной части изучаемого гена, однако конкретной закономерности установить не удалось. Тем не менее полученные данные натолкнули исследователей на идею разработать общий подход к статистической оптимизации трансляции мРНК, детерминируемой клонированным геном.

Прежде всего была создана плазмида, имеющая в своем составе слитые части генов *lac*I и *lacZ*: при транскрипции и трансляции такого химерного гена образуется белок с ферментативной активностью β-галактозидазы. Слитый ген *lac*'I'-'Z в плазмиде pLG (рис. 3.8) не имеет промотора и поэтому не экспрессируется. Встройкой линкеров в начало структурной части этого гена можно вводить различные места узнавания рестриктаз. Для каждого конкретного случая выбирается определенная последовательность нуклеотидов вводимого линкера. Если по выбранному месту расщепления рестриктазой встроить последовательность любого гена *X*, кодирующую N-концевую часть полипептида, то образованный гибридный ген будет детерминировать синтез химерного белка, по-прежнему обладающего ферментативной активностью β-галактозидазы. ДНК полученной

плазмиды pLG′ (см. рис. 3.8) можно перевести в линейную форму, расщепив ее рестриктазой вблизи начала гена *X*. Затем эту ДНК в контролируемых условиях обрабатывают нуклеазой Bal31 с целью получить линейные молекулы плазмидной ДНК различной длины. После этого часть плазмидной ДНК замещают фрагментом, содержащим промотор, SD-последовательность гена *lac*Z и пять пар нуклеотидов после SD-последовательности.

В полученной серии плазмид pLG″ трансляция химерного белка начинается с инициирующего кодона гена *X*. Причем в разных плазмидах расстояние между SD-участком и триплетом ATG не одинаково, что обусловливает различия в уровне продукции химерного белка, которые легко выявить по ферментативной активности β-галактозидазы в индивидуальных клонах плазмидосодержащих клеток. В вариантах гибридных плазмид pLG″, обеспечивающих в клетках *E. coli* наибольшую активность β-галактозидазы, осуществляют полную реконструкцию гена *X*. Получаемые плазмиды pLG‴ уже оптимизированы по трансляции мРНК, кодируемой последовательностью гена *X*.

С использованием разработанной методики была оптимизирована экспрессия в *E. coli* кодирующих последовательностей β-глобина кролика, фибробластного интерферона человека и некоторых других.

Рассмотренная схема является достаточно общей и может быть применена для других комбинаций промоторов и клонируемых генов. Несомненное преимущество данного подхода состоит в том, что он позволяет методически просто оптимизировать экспрессию на уровне трансляции любого клонированного гена прокариотического или эукариотического происхождения. При этом встраиваемый ген должен иметь непрерывную кодирующую последовательность.

Несмотря на то, что механизмы регуляции трансляции изучены пока недостаточно полно, при конструировании гибридных генов, предназначенных для автономной трансляции целевого белка в *E. coli*, активно используют природные или синтетические последовательности ДНК, кодирующие SD-участки и прилегающие к ним области. Это позволяет создавать эффективно функционирующие районы связывания рибосом на гибридных мРНК. Чаще всего используют SD-участки генов белка оболочки фага MS2, *lac*Z *E. coli* и *c*II фага λ.

Таким образом, клонирование кодирующих последовательностей в многокопийных векторах под сигналом транскрипции сильных промоторов, разработка экспериментальных схем оптимизации трансляции мРНК через оптимизацию структуры участка связывания рибосом позволяют достигать в бактериальных клетках необычайно высокого уровня продукции белков различного происхождения.

3.4. СТАБИЛИЗАЦИЯ ЧУЖЕРОДНЫХ мРНК И БЕЛКОВ В КЛЕТКАХ *E. COLI*

Для получения в клетках *E. coli* высокого уровня белкового продукта клонируемого чужеродного гена порой недостаточно увеличить дозу гена за счет копийности векторной молекулы или повысить эффективность считывания генетической информации, поместив кодирующую последовательность под эффективные сигналы транскрипции и трансляции. Такие случаи возникают, если синтезируемые в бактериальной клетке чужеродные мРНК или белки подвергаются быстрой деградации клеточными ферментами.

Известно, что в клетках *E. coli* период полужизни разных мРНК может различаться в 50 раз. На стабильность мРНК в клетке влияют ее первичная и вторичная структура. Сохранение шпилечных структур на 3′-конце после терминации транскрипции, по-видимому, значительно увеличивает период полужизни мРНК. Такие структуры обнаружены у ряда наиболее стабильных мРНК клеток *E. coli*. Для некоторых других матричных РНК экспериментально доказано, что их стабильность во многом определяется структурой некодирующей 5′-области. Так, например, при замене этого участка транскрипта β-лактамазы (период полужизни 2,5 мин) на соответствующий район мРНК гена *omp*A *E. coli* (период полужизни 15 мин) получали гибридную мРНК, по-прежнему детерминирующую β-лактамазу, но почти в 4 раза более стабильную, чем природная матрица. С другой стороны, изменение нетранслируемого 5′-конца мРНК *omp*A приводило к снижению ее стабильности. Поэтому при конструировании гибридных генов необходимо уделять внимание их 5′- и 3′-концевым районам, так как они могут оказывать существенное влияние на стабильность считываемой мРНК.

Однако для решения данной задачи исследователи чаще пользуются природными заго-

товками, т. е. изучают структуру стабильных мРНК и пытаются использовать их некодирующие районы для создания искусственных генетических конструкций. Дальнейшие углубленные исследования должны привести к пониманию того, какие элементы «архитектуры» мРНК в первую очередь определяют функциональную сохранность матрицы *in vivo*. Лишь после этого можно будет разработать обоснованную стратегию перестройки генов для увеличения периода полужизни молекул мРНК в бактериальных клетках.

Большое значение имеет также получение мутантов *E. coli* с нарушениями в ферментной системе деградации мРНК. Например, время полужизни чужеродной мРНК в клетках *E. coli*, содержащих гибридную плазмиду с геном 2-дегидрохинатдегидратазы нейроспоры, составляет 1 мин. При использовании штамма *E. coli pnp*$^-$ с дефектом по полинуклеотидфосфорилазе оно увеличилось до 25 мин, а количество фермента в бактериальных клетках возросло примерно в 50 раз. При этом время полужизни мРНК, кодируемой векторной частью плазмиды, не изменилось. Стабилизация чужеродной мРНК наблюдается также в клетках *E. coli*, мутантных по гену РНКазы I (*rna*$^-$), хотя и в гораздо меньшей степени, чем в случае *E. coli pnp*$^-$. Введение мутации по локусу *ams* (от англ. alteration of mRNA stability — изменение стабильности мРНК) приводит к значительной стабилизации всех матричных РНК в *E. coli*. Время полужизни молекул мРНК также увеличивается в клетках *E. coli* с низкой активностью РНКазы III.

Количество чужеродного белка, выявляемого в микробной клетке, определяется не только числом молекул соответствующей мРНК и временем их полужизни, но и стабильностью данного белка в гетерологичном окружении. Так, при клонировании гена *HIS3* дрожжей-сахаромицетов в штамме *E. coli pnp*$^-$ время полужизни соответствующей мРНК возрастает на порядок (с 1,5 мин в недефектном штамме до 18 мин), а уровень выявляемой активности фермента увеличивается только в 2–4 раза. Это несоответствие, по-видимому, связано с нестабильностью данного дрожжевого белка в клетках *E. coli*.

В *E. coli* обнаружен ряд протеолитических ферментов, которые участвуют в деградации белков и пептидов. При этом протеазы имеют разную локализацию в клетке, а именно: в цитоплазме, периплазме и в мембранах. Особый интерес для генетической инженерии представляет протеаза La *E. coli*. Она кодируется геном *lon*, детерминирующим синтез полипептида с молекулярной массой 94 кДа, тетрамер которого и составляет фермент. Данная протеаза локализуется в цитоплазме, и ее действие направлено на гидролиз дефектных и чужеродных белков в бактериальной клетке. Эффективная деградация белков протеазой La до низкомолекулярных пептидов сопровождается гидролизом этим же ферментом АТР. Интересно, что для разрыва пептидной связи гидролиз АТР не требуется. Считают, что энергия, получаемая при гидролизе АТР, необходима для транслокации фермента вдоль белка-субстрата и быстрой и полной его деградации без выделения в окружающее пространство продуктов частичного гидролиза белка, которые могут быть токсичны для клетки.

Мутанты *E. coli lon*$^-$ имеют сниженную способность к деградации чужеродных и дефектных белков. Это обусловливает значительное увеличение в таких мутантах времени полужизни чужеродных белков и в итоге приводит к их суперпродукции. Таким образом, введение мутации по гену *lon* реципиентных клеток *E. coli* является перспективным подходом к существенному повышению эффективности штаммов — продуцентов чужеродных белков. Введение дополнительных мутаций по некоторым генам, кодирующим другие протеазы или регулирующим выражение генов протеаз, может привести к еще большей стабилизации чужеродного белка в клетках *E. coli*. Несомненный интерес для генетической инженерии представляют такие штаммы *E. coli*, в которых объединены различные мутантные локусы, повышающие стабильность молекул как мРНК, так и белков.

Значительное влияние на активность протеаз клетки оказывают условия культивирования бактерий, и прежде всего состав питательных сред. В частности, для многих бактериальных систем известно, что протеолиз увеличивается при дефиците аминокислот, фосфатов, сульфатов. Недостаток аммония, а также культивирование при повышенной температуре приводит к сверхпродукции протеаз. Например, при прочих равных условиях интерферон $\alpha 2$ человека в клетках *E. coli* при температуре 25 °C синтезируется с выходом, большим в 40 раз, чем при температуре 37 °C.

Известно, что катионы цинка ингибируют действие протеаз *E. coli*. Поэтому, вводя в питательную среду определенное количество Zn^{2+}, можно добиться значительного увеличения уровня чужеродного белка, синтезируемого в клетках *E. coli*.

Генотип клетки — реципиента гибридной ДНК также может существенно влиять на эффективность извлечения из нее синтезированного чужеродного белка в неповрежденном виде. В частности, использование штамма *E. coli*, дефектного по гену *omp*T, детерминирующему мембранную эндопротеазу, значительно облегчает процедуру выделения нативного чужеродного белка из бактериальных клеток.

Л. Симон с сотрудниками обнаружили (1978 г.), что при инфекции *E. coli* фагами Т4, Т5 и Т7 происходит подавление деградации в клетках фрагментов белков и аномальных белков. Нормальные белки клетки при этом расщепляются с прежней скоростью. Дальнейшие исследования позволили локализовать ген *49.1* фага Т4, ответственный за этот эффект (обозначен *pin* — от proteolysis inhibition), и проклонировать его в составе векторных плазмид *E. coli* (1983 г.). Показано, что продукт гена *pin* ингибирует протеазу La клеток *E. coli*. Поэтому введение в *E. coli* гибридных плазмид, несущих фаговый ген *pin*, приводит к стабилизации, а следовательно, и к повышению выхода чужеродных белков.

К. Тэлмэйдж и В. Гилберт в 1982 г. предложили новый подход к стабилизации чужеродных белков в клетках *E. coli* путем создания гибридного гена, белковый продукт которого способен секретироваться в периплазму *E. coli* (см. 2.2.10), где он защищен от действия многочисленных протеаз цитоплазмы клетки. На примере ряда эукариотических белков показано, что таким образом удается существенно повысить выход целевого белка.

Стабилизации чужеродного белка или олигопептида в клетках *E. coli* также можно добиться, если создать ген, детерминирующий синтез высокомолекулярного белка, состоящего из нескольких тандемно повторенных копий целевого белка или пептида. Например, путем дупликации с сохранением рамки трансляции кодирующей последовательности синтетического гена соматомедина С человека, помещенного под контроль промотора p_L фага λ, т. е. при синтезе «удвоенного» пептида, удалось повысить выход соматомедина С (69 АК) в *E. coli* в 200 раз.

Интересные результаты получили Я. Ченг с соавторами (1981 г.) при изучении стабильности полипептида Х-90, представляющего собой β-галактозидазу *E. coli*, в которой отсутствуют 12 N-концевых аминокислот. В клетках, содержащих ген *lac*Z *X*-90 в составе хромосомы, протомер Х-90 активно разрушается клеточными системами белковой деградации. При клонировании гена *lac*Z *X*-90 в многокопийной плазмиде количество Х-90 составляло 50 % клеточного белка, и синтезируемый дефектный пептид образовывал агрегаты, устойчивые к протеолитической деградации.

Дальнейшие исследования показали, что в клетках *E. coli* при высоком уровне продукции как прокариотических, так и эукариотических белков, превышающем 20 % суммарного клеточного белка, во многих случаях в цитоплазме образуются ***тельца включения*** — нерастворимые агрегаты (гранулы), хорошо видимые под фазово-контрастным микроскопом. Обнаружено, что гранулы, формируемые при сверхсинтезе белка, содержат и небольшое количество примесей, в состав которых входят различные белки клетки, рибосомные РНК и даже плазмидная ДНК. Эти примеси, по-видимому, соосаждаются с белком, образующим тельца включения. В настоящее время разработаны достаточно простые методы выделения телец включения и перевода их в растворимое состояние.

В совокупности рассмотренные данные демонстрируют, что для достижения высокого уровня продукции чужеродного белка в бактериальной клетке кроме структуры гибридной молекулы ДНК большое значение имеет генотип клетки-реципиента, а также условия культивирования создаваемых штаммов. В сочетании все эти факторы могут обеспечивать в клетках *E. coli* удивительно высокий выход целевых белков, превышающий 50 % суммарного белка бактерии.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Льюин Б. Гены. М.: Мир, 1987. 544 с.

Уотсон Дж. Молекулярная биология гена. М.: Мир, 1987. 720 с.

Щелкунов С. Н. Конструирование гибридных молекул ДНК. Новосибирск: Наука, 1987. 168 с.

Auble D. T., De Haseth P. L. Promoter recognition by *Escherichia coli* RNA polymerase. Influence of DNA structure in the spacer separating the –10 and –35 regions // J. Mol. Biol. 1988. Vol. 202. P. 471–482.

Belasco J. G., Nilsson G., Gabain A. von, Cohen S. N. The stability of *E. coli* gene transcripts is dependent on determinants localized to specific mRNA segments // Cell. 1986. Vol. 46. P. 245–251.

Boros I., Lukacsovich T., Baliko G., Venetianer P. Expression vectors based on the *rac* fusion promoter // Gene. 1986. Vol. 42. P. 97–100.

Chesshyre J. A., Hipkiss A. R. Temperature-dependent loss of interferon α-2 in *Escherichia coli* // Biochem. Soc. Trans. 1987. Vol. 15. P. 1150.

Curry K. A., Tomich C. S. C. Effect of ribosome binding site on gene expression in *Escherichia coli* // DNA. 1988. Vol. 7. P. 173–179.

Dorman C. J., Barr G. C., Bhriain N. N., Higgins C. F. DNA supercoiling and the anaerobic and growth phase regulation of *ton*B gene expression // J. Bacteriol. 1988. Vol. 170. P. 2816–2826.

Edmunds T., Goldberg A. L. Role of ATP hydrolysis in the degradation of proteins by protease La from *Escherichia coli* // J. Cell. Biochem. 1986. Vol. 32. P. 187 191.

Gold L. Posttranscriptional regulatory mechanisms in *Escherichia coli* // Ann. Rev. Biochem. 1988. Vol. 57. P. 199 233.

Gorski K., Roch J. M., Prentki P., Krisch H. M. The stability of bacteriophage T4 gene 32 mRNA: a 5′ leader sequence that can stabilize mRNA transcripts // Cell. 1985. Vol. 43. P. 461–469.

Greenberg R., Gewain K. M., Shaw K. J. et al. Requirements for the high-level expression of murine interleukin-3 cDNA in *Escherichia coli* // J. Industrial Microbiol. 1988. Vol. 3. P. 333–341.

Gren E. J. Recognition of messenger RNA during translational initiation in *Escherichia coli* // Biochimie. 1984. Vol. 66. P. 1–29.

Grodberg J., Dunn J. J. *omp*T encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification // J. Bacteriol. 1988. Vol. 170. P. 1245–1253.

Helman J. D., Chamberlin M. J. Structure and function of bacterial sigma factors // Ann. Rev. Biochem. 1988. Vol. 57. P. 839–872.

Henrich B., Plapp R. Use of a cloned bacteriophage gene to disrupt bacteria // J. Biochem. Biophys. Methods. 1984. Vol. 10. P. 25–34.

Holmes W. M., Platt T., Rosenberg M. Termination of transcription in *E. coli* // Cell. 1983. Vol. 32. P. 1029–1032.

Jay E., Rommens J., Pomeroy-Cloney L. et al. High-level expression of a chemically synthesized gene for human interferon-γ using a prokaryotic expression vector // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. Vol. 81. P. 2290–2294.

Kushner S. R. Useful host strains and techniques for recombinant DNA experiments // *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular bioljgy. Washington (D. C.). 1987. Vol. 2. P. 1225–1230.

Liebart J. C., Paolozzi L., Camera M. G. et al. The expression of the DNA ligase gene of *Escherichia coli* is stimulated by relaxation of chromosomal supercoiling // Mol. Microbiol. 1989. Vol. 3. P. 269–273.

Lunberg U., Gabain A. von, Melefors O. Cleavages in the 5′ region of the *ompA* and *bla* mRNA control stability: studies with an *E. coli* mutant altering mRNA stability and a novel endoribonuclease // EMBO J. 1990. Vol. 9. P. 2731–2741.

McClure W. R. Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes // Ann. Rev. Biochem. 1985. Vol. 54. P. 171–204.

Melefors O., Gabain A. von. Site-specific endonucleolytic cleavages and the regulation of stability of *E. coli ompA* mRNA // Cell. 1988. Vol. 52. P. 893–901.

Palme K., Eckhart W. Expression of the polyoma middle-size T antigen in *Escherichia coli* // Eur. J. Biochem. 1986. Vol. 154. P. 581–585.

Panayotatos N. Recombinant protein production with minimal-antibiotic-resistance vectors // Gene. 1988. Vol. 74. P. 357 363.

DiPasquantonio V. M., Betenbaugh M. J., Dhurjati P. Improvement of product yields by temperature-shifting of *Escherichia coli* cultures containing plasmid pOU140 // Biotechnol. Bioeng. 1987. Vol. 29. P. 513–519.

Petrov P., Jay E., Ivanov I. Inclusion bodies in recombinant *E. coli* producing human calcitonin tetramer, as visualized by immuno-gold electron microscopy // Biology of the Cell. 1987. Vol. 61. P. 1–4.

Regnier P. Proteases of *Escherichia coli* // Cienc. Biol. (Portugal). 1986. Vol. 11. P. 33–40.

Rosenberg M., Court D. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription // Ann. Rev. Genet. 1979. Vol. 13. P. 319–353.

Schoner R. G., Ellis L. F., Schoner B. E. Isolation and purification of protein granules from *Escherichia coli* cells overproducing bovine growth hormone // Bio/Technology. 1985. Vol. 3. P. 151–154.

Schulz M. F., Buell G., Schmid E. et al. Increased expression in *Escherichia coli* of a synthetic gene encoding human somatomedin C after gene duplication and fusion // J. Bacteriol. 1987. Vol. 169. P. 5385–5392.

Shibui T., Uchida M., Teranishi Y. A new hybrid promoter and its expression vector in *Escherichia coli* // Argic. Biol. Chem. 1988. Vol. 52. P. 983–988.

Sinden R. R. Supercoiled DNA: biological significance // J. Chemical Education. 1987. Vol. 64. P. 294–301.

Skorupski K., Tomaschewski J., Ruger W., Simon L. D. A bacteriophage T4 gene which functions to inhibit *Escherichia coli* Lon protease // J. Bacteriol. 1988. Vol. 170. P. 3016–3024.

Sorensen M. A., Kurland C. G., Pedersen S. Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli* // J. Mol. Biol. 1989. Vol. 207. P. 365–377.

Steen R., Dahlberg A. E., Lade B. N. et al. T7 RNA polymerase directed expression of the *Escherichia*

*coli rrn*B operon // EMBO J. 1986. Vol. 5. P. 1099–1103.

Studier F. W., Moffatt B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes // J. Mol. Biol. 1986. Vol. 189. P. 113–130.

Tabor S., Richardson C. C. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. Vol. 82. P. 1074–1078.

Weintraub H., Cheng P. F., Conrad K. Expression of transfected DNA depends on DNA topology // Cell. 1986. Vol. 46. P. 115–122.

Zhang J., Deutscher M. P. Cloning, characterization, and effects of overexpression of *Escherichia coli rnd* gene encoding RNase D // J. Bacteriol. 1988. Vol. 170. P. 522–527.

Глава 4
ЭКСПРЕССИЯ КЛОНИРОВАННЫХ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

4.1. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОРГАНИЗАЦИИ И РЕАЛИЗАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ У ПРОКАРИОТ И ЭУКАРИОТ

Разработка методов генетической инженерии, позволяющих клонировать в составе молекулярных векторов отдельные гены любых организмов и вводить их в гетерологичное окружение клетки-реципиента, открыла прекрасные перспективы для решения такого фундаментального вопроса биологии, как экспрессия эукариотических генов в бактериальной клетке.

Поскольку генетический код универсален, возможность такой экспрессии определяется лишь наличием в изучаемом гене сигналов инициации и терминации транскрипции и трансляции, правильно узнаваемых прокариотической клеткой.

У прокариот существует одна РНК-полимераза, синтезирующая все типы РНК. Организация бактериальных промоторов рассмотрена в разд. 3.2. Транскрипционный аппарат эукариот сложнее. У них существует три типа РНК-полимераз: РНК-полимераза I (синтезирует рибосомные РНК), РНК-полимераза II (синтезирует матричные РНК) и РНК-полимераза III (синтезирует транспортные и 5S РНК).

При анализе известных последовательностей ДНК, прилегающих к структурной части эукариотических генов, выявлена консервативная область (блок Хогнесса), расположенная на расстоянии 25–30 нуклеотидов (к 5′-концу гена) от стартовой точки транскрипции мРНК. Последовательность блока Хогнесса

$$5'\ldots \mathrm{TATA}\binom{\mathrm{A}}{\mathrm{T}}\mathrm{A}\binom{\mathrm{T}}{\mathrm{A}}\ldots 3'$$

имеет сходство с последовательностью –10 в бактериальных промоторах. Поэтому, по крайней мере в некоторых случаях, если к 5′-концу от блока Хогнесса имеется последовательность, в достаточной степени схожая с областью -35 бактериальных промоторов, то РНК-полимераза *E. coli* может инициировать транскрипцию в правильном направлении с эукариотических ДНК-матриц.

Последовательности мРНК, необходимые для инициации трансляции, у эукариот и прокариот различаются. В участок связывания рибосом бактериальных мРНК входит последовательность, комплементарная 3′-концу 16S РНК 70S-рибосом, которая расположена в 5′-концевой нетранслируемой области мРНК (см. 3.2). В 5′-концевой нетранслируемой области некоторых матричных РНК высших эукариот обнаружены последовательности, комплементарные 3′-концу 18S РНК 80S-рибосом. Однако они отличаются от SD-участков, узнаваемых рибосомами 70S (рис. 4.1).

Существуют также различия между прокариотами и эукариотами по использованию кодонов, терминирующих трансляцию. В эукариотических мРНК используются все три терминаторных кодона (UAA, UGA и UAG), но чаще кодон UAA. В прокариотических мРНК терминация в основном происходит на кодоне UAA. Обнаружено, что на эффективность терминации трансляции также влияют последовательности мРНК, прилегающие к терминаторному кодону. Причем для про- и эукариот они различаются.

Если на нетранслируемом 5′-конце транскрипта эукариотической ДНК в непосредственной близости от инициаторного кодона случайно имеется последовательность с определенной степенью комплементарности 3′-концу прокариотической 16S рРНК, то это может обусловить связывание рибосом с данной областью и инициацию трансляции эукариотической мРНК в бактериальной клетке. А универсальность инициаторных и терминаторных кодонов может обеспечить правильную трансляцию мРНК в гетерологичной системе.

16S рРНК 5'...CCUGCGGUUGGAUCACCUCCUUA 3'

18S рРНК 5'...CCUGCGGAAGGAUCAUUA 3'

Рис. 4.1. 3′-Концевые последовательности 16S рРНК *E. coli* и 18S рРНК животных.

Подчеркнуты последовательности, комплементарные участкам RBS 5′-концевых некодирующих районов соответствующих мРНК

Таким образом, существующие в настоящее время обобщения позволяют заключить, что эукариотические гены, имеющие непрерывную кодирующую последовательность, иногда способны правильно экспрессироваться в клетках бактерий. Однако такое событие, по-видимому, будет происходить редко и с низкой эффективностью. Раздробленные (мозаичные) эукариотические гены в бактериальных клетках, где отсутствует система сплайсинга, не могут быть экспрессированы.

4.2. ЭКСПРЕССИЯ ХРОМОСОМНЫХ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ *E. COLI*

Вопрос о возможности экспрессии эукариотических генов в бактериальной клетке представляет большой научный интерес, чем объясняется значительное число посвященных ему исследований.

При встройке чужеродного фрагмента ДНК в векторную молекулу возможны различные варианты транскрипции клонированной последовательности в зависимости от расположения промотора и терминатора транскрипции (рис. 4.2). Транскрипция может начаться с промотора векторной ДНК, а терминироваться во встроенном фрагменте, и наоборот, инициироваться на фрагменте, а терминироваться на плазмидной ДНК. Кроме того, инициация транскрипции и ее терминация могут происходить полностью на клонированном фрагменте. В этом случае возможна автономная экспрессия клонированного гена, в большинстве случаев независимая от типа вектора и ориентации в нем встроенного фрагмента ДНК. Необходимо отметить, что при инициации транскрипции на промоторе вектора возможен синтез полноценного белка, детерминируемого клонированной последовательностью, при наличии в транскрипте участка связывания бактериальных рибосом.

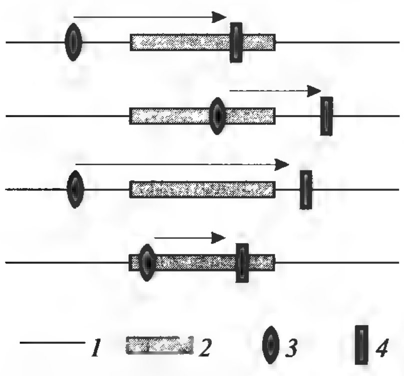


Рис. 4.2. Возможные варианты транскрипции чужеродных клонированных последовательностей ДНК:

1 — векторная ДНК; *2* — чужеродная вставка; *3* — промотор; *4* — терминатор транскрипции

Все рассмотренные варианты экспрессии клонированных генов реализованы в многочисленных экспериментальных работах. Тестирование продуктов экспрессии эукариотических генов в бактериальных клетках при этом осуществляют несколькими взаимодополняющими методами, в частности, путем оценки их ферментативной активности, иммунохимических и физико-химических свойств.

Если клонированный ген при правильной транскрипции и трансляции в бактериальной клетке обеспечивает функциональную комплементацию мутаций в геноме бактерии, то этот ген можно выявить простым отбором трансформированных гибридной ДНК бактериальных клонов на селективной питательной среде. Именно таким образом в лаборатории Р. Дэвиса в 1976 г. впервые был отобран гибридный фаг λgt, содержащий функционально активный ген имидазолглицерофосфатдегидрогеназы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Чтобы обнаружить экспрессируемый ген дрожжей, использовали штамм *E. coli*, ауксотрофный по гистидину (*his*B463). После лизогенизации мутантных клеток *E. coli* гибридными фагами λgt, несущими *Eco*RI-фрагменты дрожжевой ДНК, был получен клон, растущий на среде без гистидина. Комплементация наблюдалась при обеих ориентациях вставки относительно вектора, что указывает на автономность экспрессии клонированного гена.

Независимо аналогичные результаты получили Б. Ратзкин и Дж. Карбон (1977 г.) при клонировании коннекторным способом фрагментов ДНК дрожжей в плазмиде ColE1. Наряду с геном *HIS*3 ими дополнительно был кло-

нирован ген *LEU*2, комплементирующий мутацию *E. coli* по гену *leu*B, кодирующему β-изопропилмалатдегидрогеназу.

Дальнейшие исследования позволили выявить экспрессию в клетках *E. coli* целого ряда других генов дрожжей-сахаромицетов. Во всех случаях показано, что клетки *E. coli*, излеченные от гибридных молекул ДНК, снова становятся ауксотрофными. Используя методику комплементации мутаций *E. coli*, удалось выявить автономную экспрессию в бактериальной клетке клонированных генов других низших эукариот (табл. 4.1).

Экспрессия генов низших эукариот может происходить в клетках *E. coli* либо автономно, либо под сигналами промоторов векторных молекул. При автономной экспрессии дрожжевых генов синтез соответствующих белков происходит с низкой эффективностью. Встройка кодирующих эукариотических последовательностей под сильные бактериальные промоторы позволяет значительно увеличить уровень экспрессии. Так, при случайной встройке *in vivo* IS2-последовательности (несущей промотор) перед структурным геном дрожжей *TRP*5, находящимся в составе гибридной плазмиды pYe(*trp*5), экспрессия дрожжевого гена значительно увеличивается и колонии клеток *E. coli trp*AB17, содержащих такой вариант гибридной плазмиды, растут на селективной среде значительно быстрее.

Однако, по-видимому, далеко не все гены дрожжей способны функционировать в клетках бактерий. Так, исследователям не удалось, используя описанную выше схему, комплементировать ряд мутаций *E. coli*: *gal*T, T; *his*C, D, F; *ilv*A, C, E; *met*E; *pur*B; *thy*A; *trp*E и др. Тем не менее сам факт, что обнаружена правильная экспрессия некоторых хромосомных генов низших эукариот в бактериальной клетке, имеет огромное значение в целом для биологической науки, поскольку указывает на существенное сходство организации и функционирования генетической информации в эукариотических и прокариотических клетках.

Первую работу, доказавшую возможность правильной экспрессии генов вирусов высших эукариот в бактериальной клетке, выполнили английские ученые в 1979 г. Они проклонировали фрагменты ДНК вируса гепатита В и твердофазным радиоиммуноанализом выявили клоны *E. coli*, в которых синтезировался белок кора вируса. При инъекции кроликам экстракта штамма *E. coli*, содержащего такую плазмиду, наблюдался иммунный ответ, т. е. образование антител, которые реагировали с коровым антигеном в сыворотке крови больных людей. Расшифровка последовательности нуклеотидов вирусной ДНК показала, что ген белка кора не раздроблен.

Таблица 4.1. **Некоторые хромосомные гены низших эукариот, выявляемые функциональной комплементацией соответствующих генов *E. coli***

Источник ДНК	Ген донора	Комплементируемый ген *E. coli*
Saccharomyces cerevisiae	*HIS*3	*his*B
	*LEU*2	*leu*B
	*ARG*3	*arg*F
	*ARG*4	*arg*H
	*TRP*1	*trp*C
	*TRP*5	*trp*AB
	*URA*1	*pur*D
	*URA*3	*pur*F
	*GAL*1	*gal*K
	*ARO*1	*aro*A
	*PHR*1	*phr*-1
		*aro*B
		*aro*D
		*aro*E
		*arg*E
Neurospora crassa	*QA*2	*aro*D
	*TRP*1	*trp*C
	*PYR*4	*pyr*F
Kluyveromyces lactis	*LAC*4	*lac*Z
Shizosaccharomyces pombe		*pur*B
Candida maltosa		*leu*
Mucor racemosus		*leu*B6
Aspergillus nidulans		*pyr*F
		*arg*IF
		*pro*AB

Примечание. В том случае, когда ген донора указан, клонирован фрагмент ДНК, который в *E. coli* не экспрессирует фермент, комплементирующий указанную мутацию *E. coli*, однако ген донора не идентифицирован или не имеет принятого обозначения.

Возможность правильной экспрессии генов высших эукариот в клетках *E. coli* подтвердила работа, выполненная в лаборатории Ч. Вейсмана (1980 г.). С помощью плазмиды, несущей кДНК матричной РНК лейкоцитарного интерферона человека, в библиотеке клонированных генов человека были выявлены гибридные фаги

Рис. 4.3. Нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК, содержащего 5′-конец гена *tk* HSV-1.
Подчеркнуты инициаторные триплеты, точками отмечены стоп-триплеты, скобками — последовательности, частично комплементарные 3′-концу 16S рРНК (позиции 127–135, 138–145, 169–178, 182–188); цифры — фазы, в которых соответствующие триплеты читаются от *Eco*RI-места в гибридной плазмиде

λ, которые содержали хромосомные последовательности генов интерферона. В результате анализа 240 тыс. клонов выделили 10 клонов, 8 из которых синтезировали в *E. coli* (хотя и с низкой эффективностью) лейкоцитарный интерферон — от 3 тыс. до 50 тыс. единиц активности на 1 л бактериальной культуры. Для одного клона была расшифрована нуклеотидная последовательность вставки и показано отсутствие в гене интерферона интронов.

А. Гарапин с соавторами в 1981 г. встроили в три плазмиды серии pPC-φ (рис. 2.37) *Eco*RI-фрагмент ДНК вируса простого герпеса типа 1, содержащий ген тимидинкиназы *tk*. Интересно, что синтез тимидинкиназы в клетках *E. coli* выявлялся для всех трех возможных рамок трансляции, обеспечиваемых началом гена *lacZ*, к которому подстраивали *Eco*RI-фрагмент с геном *tk*. Однако если данный фрагмент вирусной ДНК не был помещен под бактериальный промотор, в клетках *E. coli* не удалось обнаружить синтез тимидинкиназы. Это натолкнуло на мысль о том, что независимо от начальной рамки трансляции, задаваемой в гибридной плазмиде, происходит терминация трансляции перед структурной частью гена *tk* и реинициация трансляции клонированной последовательности. После расшифровки нуклеотидной последовательности начала гена *tk* (рис. 4.3) это предположение подтвердилось. Оказалось, что трансляция последовательности *tk* в клетках *E. coli* может реинициироваться на мРНК с GUG (триплет в позиции 144 *Eco*RI-фрагмента) или с AUG (в позиции 189) в рамке считывания 3. Известно, что в системе эукариотических клеток трансляция инициируется с кодона AUG (в позиции 189). Необходимо отметить, что реинициация трансляции в эукариотической последовательности возможна еще и потому, что в районах, предшествующих инициаторным триплетам в позициях 144 и 189, имеются участки с определенной степенью комплементарности 3′-концу 16S рРНК, т. е. формируется бактериальный участок связывания рибосом (см. рис. 4.3).

Оригинальный способ был использован для клонирования гена α-амилазы *Drosophila pseudoobscura*. Известно, что клетки *E. coli* не растут на питательной среде, содержащей крахмал в качестве единственного источника углерода, так как не обладают соответствующим ферментом. Д. Ярдлей с сотрудниками в плазмиду pBR322 статистически встроили *Hin*dIII-фрагменты хромосомной ДНК дрозофилы и осуществили трансформацию клеток *E. coli* гибридными ДНК. Среди трансформантов удалось выявить клоны *E. coli*, растущие на крахмале. Синтезируемая в *E. coli* α-амилаза соответствует по своим свойствам данному ферменту дрозофилы.

Как видим, некоторые эукариотические гены с непрерывной кодирующей последовательностью могут быть экспрессированы в бактериальных клетках. Достаточно высокого уровня экспрессии таких генов можно достигнуть, встраивая их под сильные бактериальные промоторы и формируя эффективно функционирующие в *E. coli* участки связывания рибосом.

4.3. КЛОНИРОВАНИЕ ДНК-КОПИЙ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ МАТРИЧНЫХ РНК И ИХ ЭКСПРЕССИЯ В КЛЕТКАХ *E. COLI*

Большинство генов высших эукариот раздробленны, т. е. имеют экзон-интронную структуру. В результате транскрипции таких генов образуются большие пре-мРНК. При последующем сплайсинге из молекул пре-мРНК выщепляются интроны и образуется зрелая мРНК, имеющая непрерывную кодирующую последовательность. У ряда генов пре-мРНК может подвергаться альтернативному сплайсингу, давая начало целому набору молекул мРНК и соответствующих им белков. Раздробленные эукариотические гены не могут быть экспрессированы в прокариотических клетках, где отсутствует система сплайсинга. Преодолеть данное препятствие удается при использовании матричных РНК, кодируемых такими генами.

С помощью обратной транскриптазы на молекулах мРНК можно синтезировать сначала комплементарные цепи ДНК (кДНК), а затем на них достраивать вторые цепи, получая в результате двухцепочечные ДНК-копии матричных РНК. Эти фрагменты ДНК, соответствующие кодирующей последовательности генов, уже не разделенной интронами, можно встраивать в подходящий клонирующий вектор коннекторным методом или с помощью синтетических линкеров. Особо интересны эксперименты по конструированию гибридных генов, у которых кодирующая последовательность представлена эукариотической кДНК, а сигналы инициации транскрипции и трансляции имеют бактериальное происхождение. Такие гибридные гены уже способны достаточно эффективно экспрессироваться, приводя к синтезу в бактерии эукариотических полипептидов. Вследствие лучшей изученности векторной системы *E. coli* на ней выполнено большинство подобных экспериментов.

В ряде работ кДНК соединяли в составе экспрессирующих векторов с фрагментом гена *lacZ*, содержащим промотор, участок связывания рибосом и триплеты нескольких первых аминокислот β-галактозидазы *E. coli*, которые задавали рамку трансляции клонированной кодирующей последовательности. При совпадении рамок трансляции β-галактозидазы и клонированной кДНК в бактериальных клетках синтезировался целевой эукариотический белок, но содержащий на N-конце дополнительно несколько аминокислот β-галактозидазы. При этом иммунохимические свойства эукариотического белка могли сохраняться.

Первые эксперименты такого типа были выполнены в 1978 г. независимо двумя группами исследователей, которым удалось в клетках *E. coli* выявить синтез химерного белка, сохранившего иммунохимические свойства белка овальбумина кур. Продукция овальбуминоподобного белка достигала 1–1,5 % суммарного белка клетки. Данный белок содержал последовательность сигнального пептида пре-овальбумина, и этот гетерологичный сигнальный пептид, имеющий на N-конце несколько аминокислот β-галактозидазы, оказался способным выполнять функции, необходимые для секреции белка овальбумина в периплазматическое пространство клеток *E. coli*. В ходе секреции молекулы химерного белка процессировались, давая начало зрелой форме овальбумина.

Такая же схема создания гибридных генов была реализована при встройке различных кДНК в состав гена β-лактамазы плазмиды pBR322. Встроив кДНК проинсулина крысы по *Pst*I-участку pBR322, удалось получить гибридную плазмиду, в которой рамка трансляции эукариотического белка совпадала с рамкой трансляции β-лактамазы. Данная плазмида обусловливала в клетках *E. coli* синтез химерного белка, содержащего антигенные детерминанты как инсулина, так и β-лактамазы. Интересно, что этот белок также был способен секретироваться из цитоплазмы *E. coli*.

По рассмотренной схеме под контролем различных прокариотических промоторов получена экспрессия в виде химерных белков большого числа клонированных кДНК. Предложены простые способы одностадийной очистки некоторых химерных белков из экстрактов бактериальных клеток путем иммуноспецифичной аффинной хроматографии. Дж. Гермино и Д. Бастиа (1984 г.) разработали изящный метод выщепления целевого полипептида из химерного белка. Для этого создается гибридный ген, кодирующий последовательно в одинаковой рамке трансляции N-концевую часть β-галактозидазы (или другого белка, для которого имеются в достаточном количестве специфичные иммуноглобулины), внутренний фрагмент коллагена $\alpha 2$ цыпленка и изучаемый белок. Такой гибридный ген в составе экспрессирующего вектора направляет в *E. coli* синтез «тройного» химерного белка, который легко выделяется из экстракта клеток иммуноспецифичной аффинной хроматографией. Затем этот полипептид обра-

батывают коллагеназой и хроматографией высокого давления выделяют индивидуальный целевой белок. Данный подход применим для выщепления из химеры любых белков, не имеющих коллагеноподобных последовательностей.

Подобную систему предложили К. Нагаи и Х. Тоджерсен (1984 г.), но вместо коллагеназоспецифичной последовательности они использовали тетрапептид Ile–Glu–Gly–Arg, специфично узнаваемый фактором коагуляции крови Xa. Фактор Xa узнает эту последовательность в составе «тройного» химерного белка и расщепляет его только по остатку аргинина. В результате можно достаточно просто и с высокой эффективностью получать индивидуальный эукариотический белок, соответствующий по всем свойствам природному прототипу (в частности, он не имеет N-концевого метионина). Данный тетрапептид редко встречается в последовательностях белков, и поэтому разработанная система экспрессии–выщепления может быть использована для эффективной продукции в клетках *E. coli* многих эукариотических белков.

Описанный способ извлечения целевого белка из состава химерного полипептида может иметь много модификаций в зависимости от используемой протеазы (табл. 4.2). Ограниченное применение находят эндопротеазы, расщепляющие белки по определенным аминокислотным остаткам, но не имеющие протяженного участка узнавания. Такую протеазу можно применять только в том случае, если в выщепляемой целевой последовательности отсутствуют специфичные для используемого фермента аминокислотные остатки. Искусственный ген при

Таблица 4.2. **Специфичность расщепления белков некоторыми эндопротеазами**

Фермент	Последовательность[1]
Трипсин	–Lys↓– ; –Arg↓–
Протеаза V8	–Glu↓–
Клострипаин	–Arg↓–
Энтерокиназа	–$(Asp)_4$–Lys↓–
Коллагеназа	–Pro–X–Gly–Pro–Y↓–
Фактор крови Xa	–Ile–Glu–Gly–Arg↓–
α-Тромбин	–Ala–Pro–Arg↓–

[1] Стрелками обозначены гидролизуемые связи; X и Y — любые аминокислотные остатки.

этом планируется и конструируется таким образом, что целевая последовательность в химерном белке находится на С-конце и ей предшествует аминокислотный остаток, по которому эндопротеаза специфично расщепляет полипептиды. В N-концевой части химерного белка участки гидролиза используемой эндопротеазой могут встречаться сколько угодно раз. Аналогичные ограничения налагаются и на химическое расщепление белков (см. 4.4).

Д. Гоеддел с соавторами в 1979 г. впервые добились прямого эффективного синтеза индивидуального белка животных в клетках *E. coli.* Для этого к фрагменту ферментативно синтезированной кДНК гормона роста человека подстроили химически синтезированную последовательность, кодирующую первые 24 аминокислоты зрелого белка гормона роста человека, отсутствовавшие в выбранном фрагменте кДНК. Созданный структурный ген был точно встроен в плазмиду pBR322 под контроль тандема *lac*-промоторов, содержащих SD-последовательность. Полипептид, синтезировавшийся в клетках *E. coli*, несущих гибридную плазмиду, обладал физико-химическими и иммунологическими характеристиками зрелого гормона роста человека.

В 1980 г. эта же группа исследователей получила продукцию человеческого интерферона в клетках *E. coli.* С помощью химически синтезированного линкера в векторную плазмиду под контроль сильного *trp*-промотора была точно встроена кДНК лейкоцитарного интерферона $\alpha 2$ человека. При этом в клетках *E. coli*, содержащих сконструированную плазмиду, выявлялся эффективный синтез индивидуального белка интерферона человека (от $3{,}6 \cdot 10^7$ до $2{,}5 \cdot 10^8$ единиц активности интерферона на 1 л культуры). Полученный белок, как и природный интерферон человека, обладал антивирусным действием, и введение его в организм мартышек предотвращало гибель этих животных после инфицирования вирусом энцефаломиокардита.

Высокая продуктивность по интерферону ряда созданных штаммов *E. coli* позволила достаточно просто решить вопрос об очистке этого белка. Использовавшийся в клинической практике природный препарат, получаемый из донорской крови, содержал лишь около 1 % интерферона. Из штаммов-продуцентов *E. coli* удалось получить лейкоцитарный интерферон $\alpha 2$ практически в чистом виде, что обеспечило возможность его кристаллизации (1981 г.). Располагая такими индивидуальными высокоочищенными препаратами, можно подробно изучать широкий спектр свойств интерферонов человека, что и делается во многих клиниках мира.

Посредством клонирования кДНК получены штаммы *E. coli*, продуцирующие различные интерфероны человека. Имея клонированный ген, можно изменить его структуру и исследовать, как это скажется на свойствах кодируемого им белка (см. гл. 6). Накопление таких экспериментальных данных позволит глубже понять механизм действия интерферонов на клетки и организмы в целом и определить, какие модификации необходимо ввести в структуру генов интерферонов с целью направленного изменения их свойств. Первые попытки получить методами генетической инженерии необычные формы интерферонов уже дали интересные результаты, хотя пока такие работы проводятся без какой-либо теоретической подоплеки. По-видимому, в ближайшие годы мы станем свидетелями интереснейших открытий в данном направлении создания медицинских препаратов.

В настоящее время сконструировано большое число гибридных молекул, направляющих в *E. coli* экспрессию клонированных последовательностей кДНК. Упрощение методов точного извлечения сегментов ДНК (см. 1.8.2) и химического синтеза олигонуклеотидов позволяет все чаще создавать гибридные гены с заданной последовательностью нуклеотидов и добиваться синтеза в клетках *E. coli* индивидуальных эукариотических белков. За счет высокой копийности клонируемых генов и их эффективной транскрипции в бактериальных клетках удается получать интенсивный синтез полноценных биологически активных белков человека и животных. Это позволяет достаточно просто выделять данные белки практически в индивидуальном состоянии, что в большинстве случаев невозможно при использовании природных источников.

Создание микробиологических штаммов-продуцентов, позволяющих получать многие важные белки человека и животных, в первую очередь имеет огромное значение для медицины и ветеринарии.

4.4. ЭКСПРЕССИЯ В *E. COLI* ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНО СИНТЕЗИРОВАННЫХ ГЕН-ЭКВИВАЛЕНТОВ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ПОЛИПЕПТИДОВ

Ряд физиологически активных полипептидов человека, таких как нейропептиды, гормоны и др., обычно синтезируются в виде предшественников, имеющих большую молекулярную массу. В результате специфичного для каждого случая процессинга образуется зрелый полипептид или низкомолекулярный пептид (полипептидами называют пептиды, состоящие из 20 АК и более). Очевидно, что в прокариотических клетках для большинства полипептидов правильный процессинг из пре-белка происходить не может. В таких случаях в бактериальных клетках необходимо клонировать последовательность ДНК, кодирующую уже зрелую форму полипептида, обычно называемую ***ген-эквивалентом*** данного полипептида. Для этого проще всего использовать синтетические кодирующие последовательности, помещенные под контроль эффективных сигналов транскрипции и трансляции. Последовательность нуклеотидов синтетического ген-эквивалента обычно составляют, исходя из экспериментально определенной аминокислотной последовательности соответствующего (поли)пептида. При этом в структуре искусственного ген-эквивалента предпочитают использовать триплеты, наиболее часто встречающиеся в генах *E. coli* для каждой аминокислоты.

Первую экспериментальную работу в данном направлении выполнили К. Итакура с соавторами (1977 г.). Ген-эквивалент соматостатина, пептидного гормона человека (14 АК), синтезировали химическим методом и встраивали в векторные плазмиды, содержащие фрагменты *lac*-оперона *E. coli* (рис. 4.4). Если кодирующую последовательность соматостатина подстраивали к началу гена β-галактозидазы после первых семи аминокислот (плазмида pSomI), выявить синтез данного гормона в клетках *E. coli* не удавалось. Когда же этот синтетический фрагмент встраивали по *Eco*RI-месту в конце гена β-галактозидазы (плазмида pSomII-3), синтезировался химерный белок, содержащий последовательности как большей части β-галактозидазы, так и соматостатина. По-видимому, синтезировавшийся в первом случае химерный короткий полипептид легко расщеплялся внутриклеточными пептидазами, крупный же белок, образовавшийся во втором случае, был более стабилен. Соматостатин высвобождали из химерного белка, обрабатывая его бромистым цианом, при этом белок расщеплялся по метиониновым остаткам (рис. 4.5). С помощью такого остроумного подхода удалось впервые наработать в бактериальных клетках в составе химерного белка пептид человека, а затем химически вы-

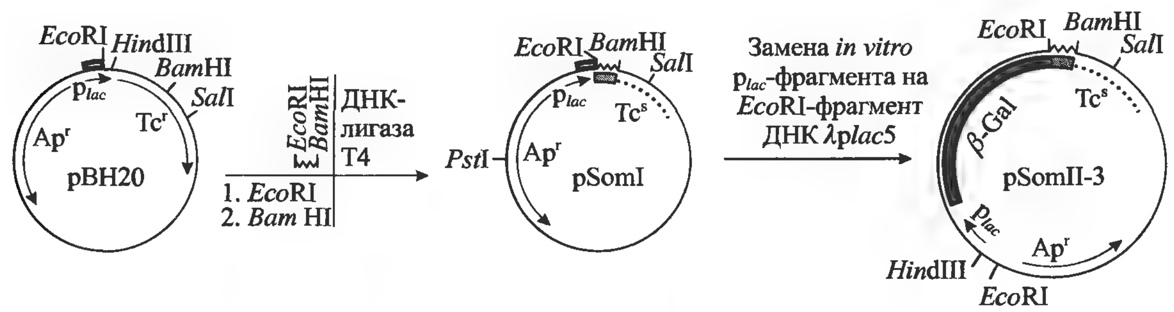


Рис. 4.4. Схема конструирования гибридных плазмид, содержащих синтетический ген-эквивалент соматостатина.

Ломаной линией обозначен синтетический *Eco*RI–*Bam*HI-фрагмент ДНК, содержащий структурный ген соматостатина

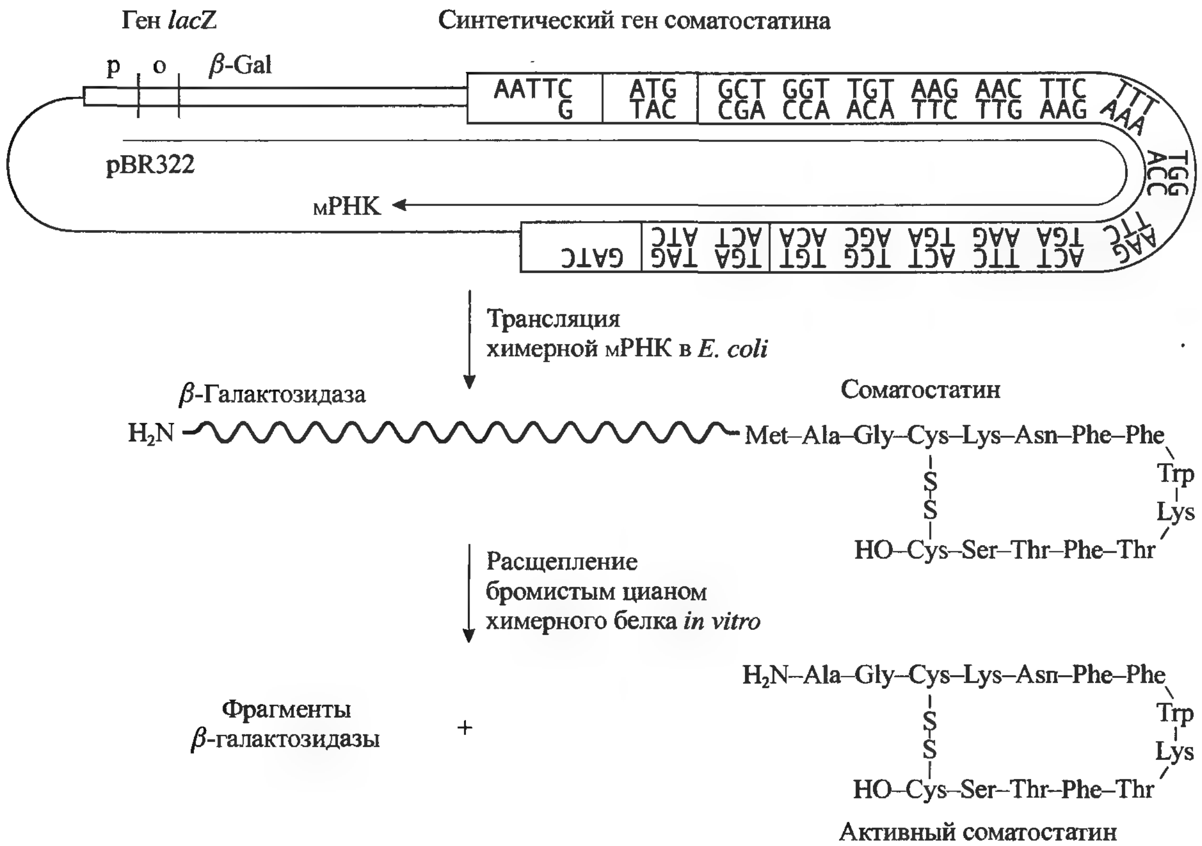


Рис. 4.5. Схема микробиологического способа получения соматостатина

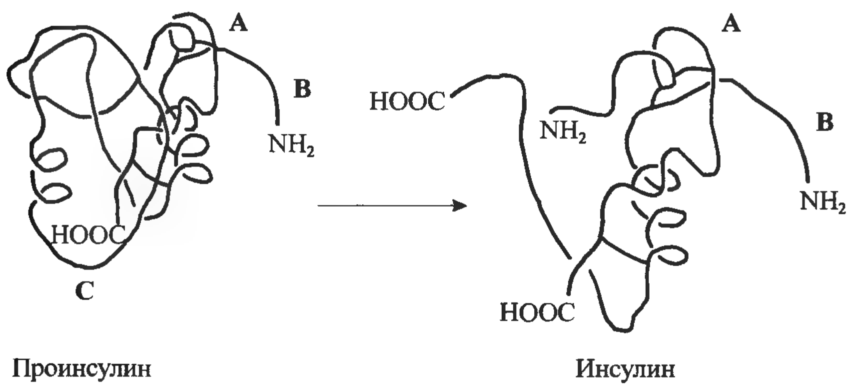


Рис. 4.6. Ферментативный процессинг *in vivo* проинсулина в инсулин

щепить и очистить его до индивидуального состояния.

Таким образом, суть разработанной стратегии заключается в том, что искусственный ген встраивается внутрь структурного гена, кодирующего определенный бактериальный белок. Инициация синтеза РНК и белка происходит на регуляторных участках бактериального оперона, а терминация трансляции — на нонсенс-кодонах* синтетического гена. Экспрессия такого гибридного гена приводит к появлению химерного белка, содержащего аминокислотную последовательность бактериального белка и пептида, кодируемого синтетическим фрагментом ДНК. Необходимо, чтобы встраиваемая нуклеотидная последовательность кодировала пептид без сдвига рамки трансляции по отношению к бактериальному гену. Целевой пептид при этом можно выщеплять из состава химерного белка специфичным химическим или ферментативным гидролизом.

Этот подход был очень удачно использован в той же лаборатории для микробиологического синтеза инсулина человека. Известно, что инсулин синтезируется в поджелудочной железе как препрогормон с сигнальным пептидом, который обусловливает секрецию белка из клеток. Препроинсулин синтезируется на мембранносвязанных рибосомах, и в процессе секреции сигнальный пептид от молекулы отщепляется. Образующийся при этом проинсулин имеет сложную трехмерную структуру с тремя дисульфидными связями (рис. 4.6). На следующем этапе из середины проинсулина протеолитически выщепляются 35 аминокислот. Эта полипептидная последовательность называется С-цепью, N-концевой полипептид в инсулине — В-цепью (30 АК), а С-концевой — А-цепью (21 АК). А- и В-цепи в инсулине остаются связаны дисульфидными мостиками, образованными еще в проинсулине, что обеспечивает стабильность четвертичной структуры зрелого белка. Как видим, инсулин образуется в результате ряда этапов процессинга первоначально синтезированного белка-предшественника. В бактериальных клетках такой процессинг произойти не может. К важным свойствам инсулина следует отнести то, что он не содержит углеводных боковых групп (не гликозилирован), а в А- и В-цепях нет метиониновых остатков.

Кодирующие последовательности А- и В-цепей инсулина синтезировали химическим путем и встраивали в структурную часть гена *trp*E (антранилатсинтетазы) в составе векторной плазмиды в правильной рамке трансляции. Из образовавшихся химерных полипептидов бромистым цианом выщепляли последовательности А- и В-цепей, которые затем смешивали и химически генерировали дисульфидные связи. Сконструированный таким образом инсулин обладал теми же биологическими свойствами, что и природный белок.

Крупные эукариотические полипептиды менее подвержены пептидазной деградации в клетках *E. coli*. Примером может служить продукция в *E. coli* некоторых индивидуальных белков животных (см. 4.3). Эти данные позволили разработать стратегию синтеза и клонирования гена такого крупного белка человека, как лейкоцитарный интерферон $\alpha 1$. Группой английских исследователей в 1981 г. был синтезирован фрагмент двухцепочечной ДНК длиной около 500 пн, который затем встроили в плазмиду под контроль промоторов p_{lac} или p_{trp}. После введения гибридных ДНК в клетки *E. coli* в них наблюдали эффективный синтез индивидуального белка интерферона человека.

Сотрудниками Института биоорганической химии РАН (Москва) и ВНИИ молекулярной биологии НПО «Вектор» (Новосибирск) совместно синтезирован и собран искусственный ген лейкоцитарного интерферона $\alpha 2$ человека (1982 г.). Синтетический ген встраивали в различные векторные молекулы и изучали его экспрессию в клетках *E. coli* в зависимости от того, в составе какой гибридной ДНК он находится.

Японские (1983 г.) и канадские (1984 г.) исследователи химически синтезировали ген иммунного интерферона человека и продемонстрировали его экспрессию в клетках *E. coli* в составе векторных плазмид под контролем промотора гена *lacZ UV5* или синтетического раннего промотора фага Т5. Причем в последнем случае уровень продукции интерферона достигал $4 \cdot 10^9$ единиц активности на 1 л культуры.

---

* Терминаторные кодоны UAG, UGA и UAA не кодируют аминокислот и получили название нонсенс-кодонов. Иногда происходят мутации, ведущие к появлению нонсенс-кодонов внутри гена. Такие мутации приводят к преждевременной терминации полипептидной цепи. Эффект нонсенс-мутации может быть супрессирован второй мутацией, которая приводит к синтезу измененной молекулы тРНК. Такая супрессорная тРНК узнает нонсенс-кодон и встраивает определенную аминокислоту в соответствующее место полипептидной цепи, восстанавливая синтез полноразмерного белка. Терминаторные кодоны получили индивидуальные названия: UAG — amber, UAA — ochre, UGA — opal. В геноме *E. coli* картировано не менее 17 генов супрессоров всех трех типов нонсенс-кодонов.

Методология химического синтеза олигонуклеотидов в настоящее время вышла на такой уровень, что позволяет синтезировать целые гены, осуществлять *in vitro* тонкие перестройки генетического материала. Это открывает широкие возможности для конструирования эффективных микробиологических продуцентов биологически активных соединений, крайне необходимых для медицины и сельского хозяйства. Кроме того, тонкое манипулирование генетическим материалом позволяет проводить исследования, расширяющие наше понимание организации и функционирования генов как в прокариотах, так и в эукариотах.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Щелкунов С. Н. Конструирование гибридных молекул ДНК. Новосибирск: Наука, 1987. 168 с.

Щелкунов С. Н., Рязанкина О. И., Крыкбаев Р. А., Белавин П. А. Экспрессия последовательностей ДНК ортопоксвирусов в клетках *Escherichia coli* // Молекуляр. биология. 1992. Т. 26. С. 772–779.

Allen G., Winther M. D., Henwood C. A. et al. Synthesis and cloning of a gene coding for a fusion protein containing mouse epidermal growth factor // J. Biotechnology. 1987. Vol. 5. P. 93–114.

Asagoe Y., Yasukana K., Saito T. et al. Human B-cell stimulatory factor-2 expressed in *Escherichia coli* // Bio/Technology. 1988. Vol. 6. P. 806–809.

Calogeno R. A., Pon C. L., Gualerzi C. O. Chemical synthesis and *in vivo* hyperexpression of a modular gene coding for *Escherichia coli* translational initiation factor IF1 // Mol. Gen. Genet. 1987. Vol. 208. P. 63–69.

Chernin M. I., Stevens S. M., Kline E. L., Yardley D. G. An amylase gene from *Drosophila pseudoobscura* is expressed in *Escherichia coli* // Biochim. Biophys. Acta. 1987. Vol. 910. P. 63–71.

Goeddel D. V., Kleid D. G., Bolivard F. et al. Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. Vol. 76. P. 106–110.

Heaphy S., Singh M., Gait M. J. Cloning and expression in *E. coli* of synthetic gene for the bacteriocidal protein caltrin/seminalplasmin // Protein Engineering. 1987. Vol. 1. P. 425–431.

Hostomsky Z., Appelt K., Ogden R. High-level expression of self-processed HIV-1 protease in *Escherichia coli* using a synthetic gene // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1989. Vol. 161. P. 1056–1063.

Inouye S., Aoyama S., Miyata T. et al. Overexpression and purification of the recombinant Ca^{2+}-binding protein, apoaequorin // J. Biochem. 1989. Vol. 105. P. 473–477.

Itakura K., Hirose T., Crea R. et al. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin // Science. 1977. Vol. 198. P. 1056–1063.

Kaji H., Kumagai I., Takeda A. et al. Studies on chemical synthesis of human cystatin A gene and its expression in *Escherichia coli* // J. Biochem. 1989. Vol. 105. P. 143–147.

Louis J. M., Wondrak E. M., Copeland T. D. et al. Chemical synthesis and expression of the HIV-1 protease gene in *E. coli* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1989. Vol. 159. P. 87–94.

Nagai K., Thogersen H. C. Generation of β-globin by sequence-specific proteolysis of a hybrid protein produced in *Escherichia coli* // Nature. 1984. Vol. 309. P. 810–812.

Nishikawa S., Yanase K., Tokunaga-Doi T. et al. Efficient cleavage by α-thrombin of a recombinant fused protein which contains insulin-like growth factor I // Protein Engineering. 1987. Vol. 1. P. 487–492.

Sancar G. B. Expression of a *Saccharomyces cerevisiae* photolyase gene in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 1985. Vol. 161. P. 769–771.

Seow H. F., Goh C. R., Krishnan L., Porter A. G. Bacterial expression, facile purification and properties of recombinant human lymphotoxin (tumor necrosis factor beta) // Biotechnology. 1989. Vol. 7. P. 363–368.

Shirabe K., Yubisui T., Takeshita M. Expression of human erythrocyte NADH-cytochrom b_5 reductase as an α-thrombincleavable fused protein in *Escherichia coli* // Biochim. Biophys. Acta. 1989. Vol. 1008. P. 189–192.

Глава 5
КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММОВ — ПРОДУЦЕНТОВ ПЕРВИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ НА ОСНОВЕ *ESCHERICHIA COLI*

Уже первые эксперименты показали, что, увеличивая дозу бактериальных генов за счет клонирования их в многокопийных молекулярных векторах, удается значительно повысить в клетках *E. coli* продукцию белков, кодируемых этими генами (см. 3.1). В связи с этим встал вопрос о возможности использовать методы генетической инженерии для конструирования эффективных штаммов — продуцентов первичных метаболитов, таких как аминокислоты, витамины и др. Исходили из того, что повышение в бактериальной клетке уровня активности определенных ферментов (или одного фермента), контролирующих лимитирующие стадии биосинтетического пути выбранного первичного метаболита, может привести к суперсинтезу последнего.

Успех создания высокоактивных штаммов с заданными свойствами во многом зависит от уровня знаний об организации генома и регуляции метаболизма микробной клетки. Наиболее изученной является бактерия *E. coli*, и поэтому первые работы по созданию методами генетической инженерии промышленных штаммов — продуцентов первичных метаболитов выполнены на данном микроорганизме.

Блестящий цикл исследований провели В. Г. Дебабов с сотрудниками (1979–1982 гг.), впервые продемонстрировав большие возможности генетической инженерии для получения штаммов — продуцентов аминокислот. Наиболее показателен пример создания штамма — продуцента *L*-треонина на основе лабораторного штамма *E. coli*.

На рис. 5.1 показан путь биосинтеза *L*-треонина из аспарагиновой кислоты, из которой помимо треонина образуются изолейцин, лизин и метионин, составляющие аспарагиновое семейство аминокислот. В биосинтезе треонина участвуют четыре фермента, три из которых детерминируются генами треонинового оперона (*thr*-оперон). Реакция превращения аспартилфосфата в полуальдегид аспарагиновой кислоты катализируется продуктом гена *asd*, не входящего в этот оперон. Данная стадия не лимитирует процесс и поэтому в дальнейшем не рассматривается. Ген *thr*A_1A_2 кодирует один полипептид, который имеет доменную структуру и обладает двумя ферментативными активностями: аспартокиназы I и гомосериндегидрогеназы I. Ген *thr*B кодирует гомосеринкиназу, а ген *thr*C — треонинсинтетазу. При повышенном уровне совместно треонина и изолейцина экспрессия *thr*-оперона подавляется (репрессия). Кроме того, активность фермента аспартокиназы I — гомосериндегидрогеназы I ингибируется конечным продуктом рассматриваемого пути биосинтеза — треонином (ретроингибирование).

На первом этапе создания штамма-продуцента в составе единого фрагмента ДНК в плазмиде pBR322 был клонирован весь *thr*-оперон. Полученная за счет этого амплификация генов треонинового оперона привела к возрастанию в клетке уровня активности соответствующих ферментов и, как следствие, к увеличению биосинтеза треонина. Более того, бактерии, содержавшие гибридную плазмиду, приобретали способность выделять треонин в культуральную среду. Полученный штамм *E. coli* накапливал треонин в относительно большом количестве — 1–2 г/л питательной среды, однако это не является сверхпродукцией.

Биосинтез треонина у *E. coli* контролируется с помощью нескольких регуляторных систем (см. рис. 5.1). Чтобы обеспечить сверхсинтез этой аминокислоты, необходимо нарушить, по крайней мере, наиболее мощные системы регуляции. Работа по получению эффективного штамма — продуцента треонина велась авторами по двум направлениям: улучшение конструкции гибридной плазмиды и создание штамма-реципиента *E. coli*, обеспечивающего повышенное накопление аминокислоты. Поэтому на

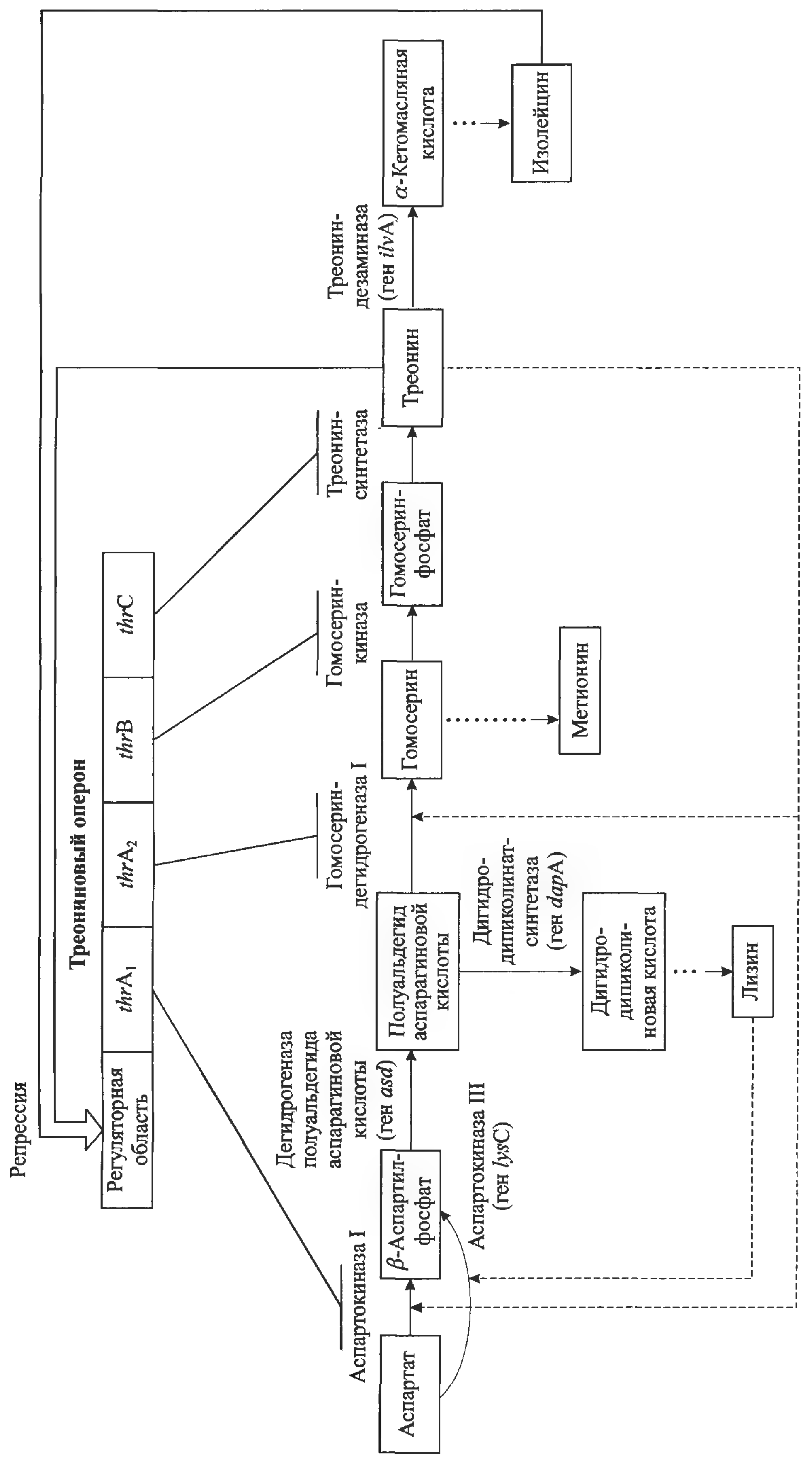


Рис. 5.1. Схема биосинтеза аминокислот аспарагинового семейства

следующем этапе работы в составе вектора pBR322 был клонирован треониновый оперон, несущий мутацию *thr*A442, которая делает ферментный комплекс аспартокиназа–гомосериндегидрогеназа нечувствительным к ретроингибированию треонином.

В качестве реципиента для гибридной плазмиды создали штамм *E. coli* VL334, имеющий мутации *thr* C1010 и *ilv*A442. Он является двойным ауксотрофом и нуждается для роста на минимальной среде в треонине и изолейцине. Мутация *ilv*A442 изменяет треониндезаминазу (первый фермент на пути превращения треонина в изолейцин) таким образом, что данный фермент не инактивируется полностью, а лишь имеет резко сниженное сродство к своему субстрату — треонину. Такие неполные мутации называют leaky-мутациями (подтекающими). Мутация *thr* C1010 полностью инактивирует ген треонинсинтетазы клеток *E. coli*.

После трансформации плазмидой pYN7, которая несет треониновый оперон с мутацией *thr*A442, штамм *E. coli* VL334 становился прототрофным по треонину. При этом происходил сверхсинтез треонина, что в свою очередь обусловливало частичную супрессию ауксотрофности по изолейцину (благодаря leaky-мутации по гену *ilv*A), т. е. клетки приобретали способность расти на минимальной среде без добавок аминокислот. Значительное уменьшение превращения треонина в изолейцин (мутация *ilv*A442) предотвращает репрессию треонинового оперона, более того, продукт гена *thr*A442, расположенного на плазмиде, не подвергается ретроингибированию треонином. Все это способствует накоплению треонина в клетках в большом количестве с последующим выделением его в среду. Полученный штамм *E. coli* VL334[pYN7] накапливал в культуральной жидкости треонин в концентрации уже до 20 г/л.

Очень важная особенность полученного штамма — стабильность поддержания им гибридной плазмиды за счет автоселекции плазмидосодержащих клеток на минимальной питательной среде. На такой среде могут расти только клетки VL334, содержащие плазмиду pYN7, которая из-за сверхсинтеза треонина обеспечивает им прототрофный фенотип $Thr^{+}Ile^{+}$. Клетки, утратившие плазмиду или содержащие измененную плазмиду, из культуры удаляются, так как не могут расти на минимальной среде. Такие клетки приобретают способность к росту только на последних этапах ферментации культуры, когда концентрация треонина в среде достигает 10–15 г/л. Появление бесплазмидных клеток на этой стадии мало сказывается на конечной концентрации треонина в культуральной жидкости.

Штаммы *E. coli* K12, к которым относится и VL334, растут на минимальной среде с глюкозой или фруктозой, но не усваивают сахарозу и такой доступный и дешевый субстрат, как меласса. Поэтому с помощью конъюгации в штамм VL334[pYN7] ввели гены, детерминирующие способность к усвоению сахарозы. После оптимизации условий культивирования созданного варианта *E. coli* удалось добиться продукции *L*-треонина до 70 г/л за 30–40 ч ферментации с конверсией около 40 % сахара в целевой продукт. При использовании только методов генетической инженерии или селекции такой штамм получить невозможно. Творческое совмещение этих двух подходов позволило добиться небывалых ранее результатов.

Гены ферментов биосинтетического пути лизина разбросаны по бактериальной хромосоме, а не сгруппированы в полицистронный оперон, как в случае треонина. Поэтому для создания методами генетической инженерии штаммов — суперпродуцентов лизина требуется несколько иной подход. В лаборатории К. Паттэ (1981 г.) были раздельно клонированы гены биосинтетического пути лизина в составе многокопийной плазмиды pBR322. Вводя каждую гибридную плазмиду в определенный реципиентный штамм *E. coli*, можно проконтролировать, повышение дозы какого гена приведет к увеличению синтеза лизина. Тем самым можно выявить лимитирующую стадию биосинтеза этой аминокислоты для каждого конкретного штамма-реципиента. Авторы использовали штамм *E. coli* TOC R 21, который имел две мутации по гену *lys*C и обеспечивал сверхсинтез лизина. Одна мутация обусловливала нечувствительность аспартокиназы III к ретроингибированию лизином, а вторая обеспечивала конститутивную экспрессию гена *lys*C. Введение в такой штамм гибридных плазмид с разными генами исследуемого биосинтетического пути показало, что только амплификация гена *dap*A в составе плазмиды приводит к повышению синтеза лизина.

Подходы к созданию штаммов — суперпродуцентов первичных метаболитов имели дальнейшее развитие в исследованиях С. Сугимото с соавторами (1987 г.), получивших штамм *E. coli* с высоким уровнем синтеза фенилаланина. В состав гибридной плазмиды были встроены термочувствительный ген cI_{857} белка-репрессора фага λ и под контролем промотора

λp_R — ген *aro*F, а под контролем λp_L — ген *phe*A. Оба гена *E. coli* несли мутации, делающие соответствующие ферменты нечувствительными к ретроингибированию эндопродуктами (тирозином и фенилаланином). При температуре 30 °С клонированные гены не экспрессировались. Повышение температуры приводило к инактивации фагового репрессора и индукции интенсивной транскрипции с фаговых промоторов. Максимальная продукция фенилаланина созданным штаммом наблюдалась при температуре 38,5 °С. При более высокой температуре клетки погибали, по-видимому, вследствие суперэкспрессии клонированных генов.

Рассмотренные примеры со всей очевидностью демонстрируют большие возможности генетической инженерии в создании штаммов бактерий — суперпродуцентов не только целевых белков, но и низкомолекулярных первичных метаболитов. Дальнейшее развитие исследований в этом направлении позволило сконструировать широкий спектр штаммов, высокопродуктивных по определенным аминокислотам, витаминам и др.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Биотехнология: Учеб. пособие для вузов. В 8 кн. / Под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. Кн. 2. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов / В. Г. Дебабов, В. А. Лившиц. М.: Высш. шк., 1988. 208 с.

Jakowec M. W., Smith L. T., Dandekar A. M. Recombinant plasmid conferring proline overproduction and osmotic tolerance // Appl. Environ. Microbiol. 1985. Vol. 50. P. 441–446.

Kimura A. Application of recDNA techniques to the production of ATP and glutathione by the «Syntechno system» // Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 1986. Vol. 33, P. 29–51.

Miwa K., Tsuchida T., Kurahashi O. et al. Construction of L-threonine overproducing strains of *Escherichia coli* K-12 using recombinant DNA techniques // Agric. Biol. Chem. 1983. Vol. 47. P. 2329–2334.

Reverend B. D., Boitel M., Deschamps A. M. et al. Improvement of *Escherichia coli* strains overproducing lysine using recombinant DNA techniques // Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1982. Vol. 15. P. 227–231.

Sugimoto S., Yabuta M., Kato N. et al. Hyperproduction of phenylalanine by *Escherichia coli*: application of a temperature-controllable expression vector carrying the repressor-promoter system of bacteriophage lambda // J. Biotechnology. 1987. Vol. 5. P. 237–253.

Suryanarayana V. V. S., Rao B. U., Padayatty J. D. Cloning and expression of the cDNA for the major antigen of foot and mouth disease virus type Asia I 63/72 // Curr. Science, 1985. Vol. 54. P. 1044–1048.

Tanese N., Prasad V. R., Goff S. P. Structural requirements for bacterial expression of stable, enzymatically active fusion proteins containing the human immunodeficiency virus reverse transcriptase // DNA. 1988. Vol. 7. P. 407–416.

Thiele U., Auerswald E. A., Gebhard W. et al. Gene synthesis, expression and isolation of an inhibitory active MS-2 pol-stefin B fusion protein and preparation of Des[Met$_1^{1,2}$] stefin B // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1988. Vol. 369. P. 1167–1178.

Глава 6
НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ МОЛЕКУЛ ДНК *IN VITRO*

Для генетического анализа какого-либо вида организмов необходимо выявление мутантов с определенными физиологическими дефектами (отличиями от особей, принятых за дикий тип). До недавнего времени такие мутанты получали только в результате статистического (случайного, ненаправленного, общего) мутагенеза популяции организмов с последующей селекцией или отбором мутантов, обладающих характерным фенотипом. Измененный ген в выделенных мутантах может быть затем локализован на геноме путем комплементационного или рекомбинационного анализа с другими мутантами или методами физического картирования. Появление методов генетической инженерии позволило с помощью клонирования в молекулярных векторах извлекать отдельные гены даже из очень больших и сложно организованных геномов. Для клонированных генов может быть расшифрована последовательность нуклеотидов, а на ее основе — аминокислотная последовательность кодируемого белка. Более того, можно клонировать, а затем сравнивать последовательности гена (белка) дикого типа и мутантных форм. Исходя из полученной информации можно определить, какие изменения структуры гена (белка) приводят к тому или иному изменению фенотипа организма.

Недостатком данного подхода является то, что фенотипически проявляются, как правило, далеко не все мутации по определенному гену, а только те, которые значительно нарушают функцию этого гена. Кроме того, мутации по разным участкам изучаемого гена могут иметь одно и то же фенотипическое проявление. Поэтому тонкий анализ структурно-функциональной организации гена (и/или кодируемого им белка) с помощью данного классического молекулярно-генетического подхода затруднен.

Крайне привлекательной оказалась идея использовать для выполнения таких исследований методические достижения генетической инженерии. Зная структуру клонированного гена, можно спланировать и осуществить его реконструкцию, которая по имеющимся представлениям должна привести к изменению уровня его экспрессии в выбранной системе клеток, к изменению определенных свойств белка, кодируемого данным геном и т. д., либо можно провести случайный мутагенез выделенного гена или его участка, отобрать различные мутантные формы и оценить их свойства. Созданные варианты генов затем можно рекомбинационно ввести в исходный геном и изучить их влияние на функционирование данного генома в целом. Важно подчеркнуть, что мутагенезу подвергается только строго определенный локус, а весь остальной геном не изменяется (при общей мутагенной обработке организма исследователь обычно не может быть уверен, что мутация прошла только по изучаемому локусу и не возникло мутаций по другим генам). Рассматриваемый подход, по существу, противоположен классическому генетическому, так как здесь исследования направлены от гена к признаку. Поэтому его часто называют ***обратной генетикой***.

Возможность вводить в изолированный ген заранее запланированные мутации — делеции, вставки или специфические замены нуклеотидов — была настолько заманчивой, что побудила большую группу ученых разных лабораторий к разработке методов направленного мутагенеза *in vitro*.

Эти исследования проводятся в двух направлениях:

- сегмент-направленный мутагенез, являющийся статистическим мутагенезом, действие которого определенным образом ограничено лишь выбранным районом молекулы ДНК (плазмидной или вирусной);
- сайтспецифический мутагенез, под которым подразумевают введение предопределенных мутаций в заранее запланированное место (точку, сайт) изучаемого фрагмента ДНК.

6.1. ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫЕ ДЕЛЕЦИИ И ВСТАВКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК

Прежде чем рассматривать, как развивались методы направленного мутагенеза, остановимся на анализе изменений, которые можно вводить в молекулы ДНК вирусов и плазмид с помощью «классических» генно-инженерных процедур без привлечения других подходов (например обработки мутагенами). Очевидно, что в данном случае возможные изменения молекул ДНК ограничиваются делециями и вставками. Самый простой вариант получения делеций — расщепление молекулы ДНК рестриктазой, которая имеет на ней более одного участка узна-

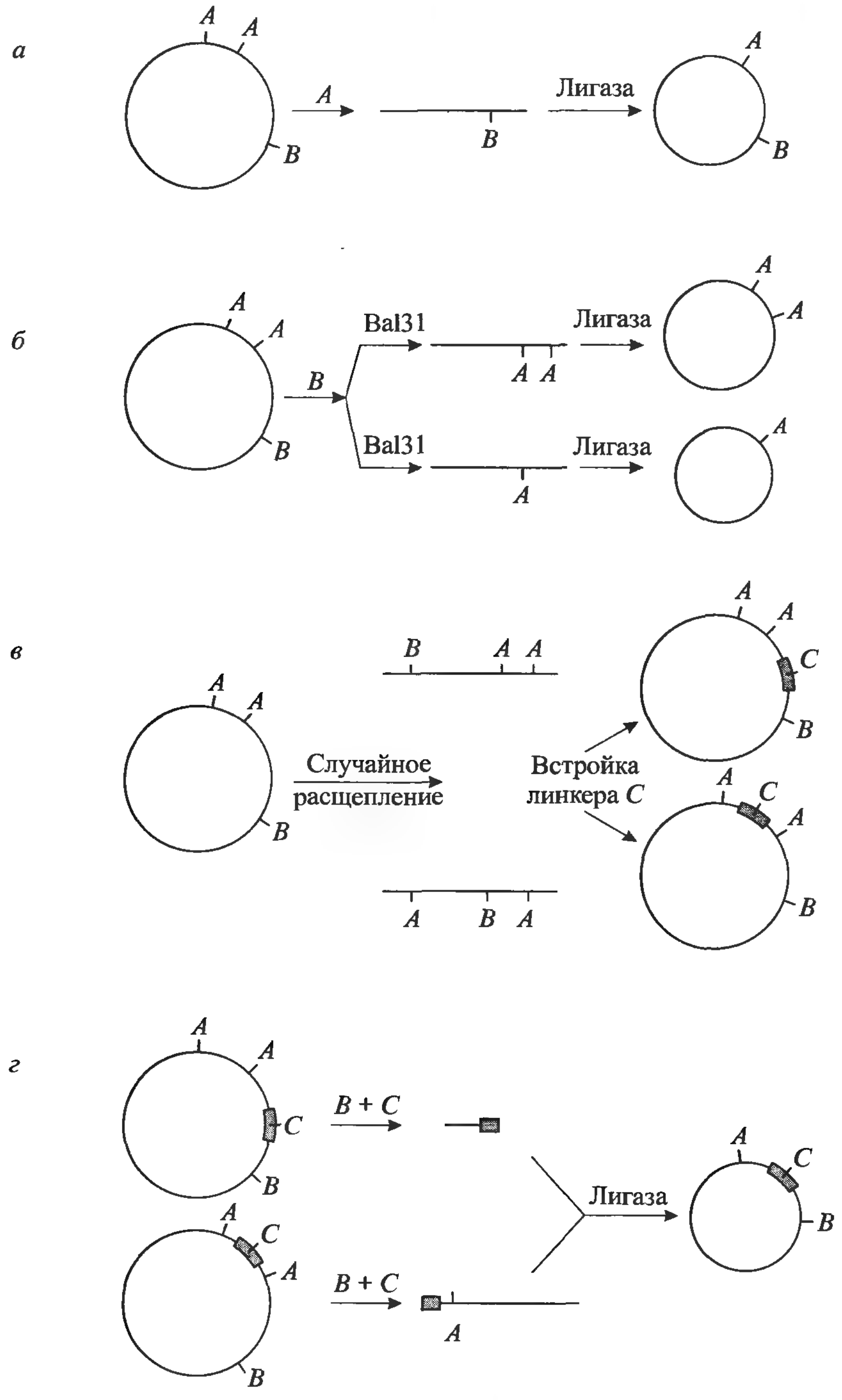


Рис. 6.1. Схемы конструирования делеционных и инсерционных (вставочных) мутантов:

а — рестриктазно-лигазное делетирование; *б* — экзонуклеолитическое делетирование; *в* — случайная встройка линкера (фрагмента); *г* — делетирование между линкерами. *A*, *B*, *C* — рестриктазы и места их узнавания на молекулах ДНК

вания, с последующим лигированием полученного препарата ДНК. При этом часть образуемых молекул будет укорочена вследствие выщепления одного или нескольких рестрикционных фрагментов (рис. 6.1, *а*). Такой подход очень часто используют при генно-инженерных реконструкциях молекул ДНК (например, см. рис. 2.7, 2.10).

Второй распространенный вариант введения делеций в кольцевые двухцепочечные ДНК *in vitro* заключается в том, что ДНК расщепляют в определенном месте рестриктазой и образовавшуюся линейную молекулу обрабатывают нуклеазой Bal31, которая гидролизует молекулу ДНК с обоих концов, деградируя одновременно обе цепи. В результате можно получить большой набор укороченных линейных молекул, которые после циклизации в лигазной реакции формируют соответствующий набор кольцевых ДНК с делециями (см. рис. 6.1, *б*). Данный подход используется, в частности, при оптимизации структуры гибридных генов (например, см. рис. 3.8).

Интересен вариант мутагенеза молекул ДНК за счет встройки в случайные места экзогенных сегментов ДНК — природных фрагментов или синтетических линкеров (см. рис. 6.1, *в*). Случайные двухцепочечные разрывы можно вводить в молекулы ДНК путем кратковременного воздействия на них небольшого количества панкреатической ДНКазы I в присутствии катионов Mn^{2+}. Получить молекулы ДНК с одиночными разрывами в разных местах можно, обрабатывая их рестриктазой, имеющей много участков узнавания на данном субстрате, так чтобы каждая молекула ДНК гидролизовалась в среднем лишь по одному участку. Таким образом, в частности, был получен первый гибридный фаг M13mp1 (см. 2.2.6).

Более сложный метод введения делеций *in vitro* приведен на рис. 6.1, *г*. Все показанные на рис. 6.1 варианты конструирования мутантов (за исключением *б*) приложимы и к линейным молекулам ДНК, например ДНК фага λ, и читатель сам может представить схемы этих процедур.

6.2. СТАТИСТИЧЕСКИЙ МУТАГЕНЕЗ ГИБРИДНЫХ ДНК

Вводя делеции или инсерции *in vitro*, можно достаточно легко локализовать функциональные элементы или кодирующие последовательности клонированных генов. Для более тонкого анализа организации гена (белка) необходимо использовать методы мутагенеза. Проще всего большое разнообразие мутаций можно получить при статистическом мутагенезе клонированного гена. Самый доступный вариант — общий мутагенез гибридной ДНК, содержащей целевой ген. Основным недостатком данного подхода является то, что мутагенез затрагивает все генетические локусы обрабатываемой молекулы ДНК. Поэтому при увеличении глубины мутагенеза, т. е. введении нескольких мутаций на молекулу, наряду с искомыми могут возникать мутации и по жизненно важным функциям вирусной или плазмидной ДНК. Такие молекулы ДНК уже будут нежизнеспособны и после трансфекции (трансформации) реплицироваться в клетках не будут.

Репликация плазмидных молекул ДНК, обеспечивающая их жизнеспособность, осуществляется ферментами клетки, и необходимые для этого процесса генетические локусы плазмид, как правило, устроены просто и имеют небольшой размер. Поэтому при мутагенезе плазмидных ДНК их жизненно важные функции (вследствие малого размера мишени) повреждаются с относительно невысокой частотой. Вирусные геномы в отличие от плазмидных содержат большое число жизненно необходимых генов и при мутагенезе теряют жизнеспособность с большей относительной частотой. Поэтому плазмидные молекулы ДНК по сравнению с вирусными можно подвергать более глубокой мутагенной обработке при сохранении их жизнеспособности.

Поиск оптимальных условий мутагенеза плазмидных ДНК *in vitro* дал положительные результаты. Высокая эффективность мутагенеза достигалась при использовании гидроксиламина (ГА) и в еще большей степени его производных типа О-метилгидроксиламина (ОМГА) (рис. 6.2). Большим достоинством данных мутагенов является детальная изученность механизма их действия на нуклеиновые кислоты. Они обладают высокой специфичностью и взаимодействуют в основном с цитозином и на два порядка менее эффективно — с аденином. При этом более сильным мутагеном является ОМГА, поскольку продукт его реакции с цитозином имеет в основном кетоформу, спаривающуюся с аденином, в то время как аналогичный продукт ГА N-4-гидроксицитозин находится в кето- и енольной формах в соотношении примерно 1 : 1. Важно отметить, что ОМГА, как и ГА, атакует те азотистые основания, плоскос-

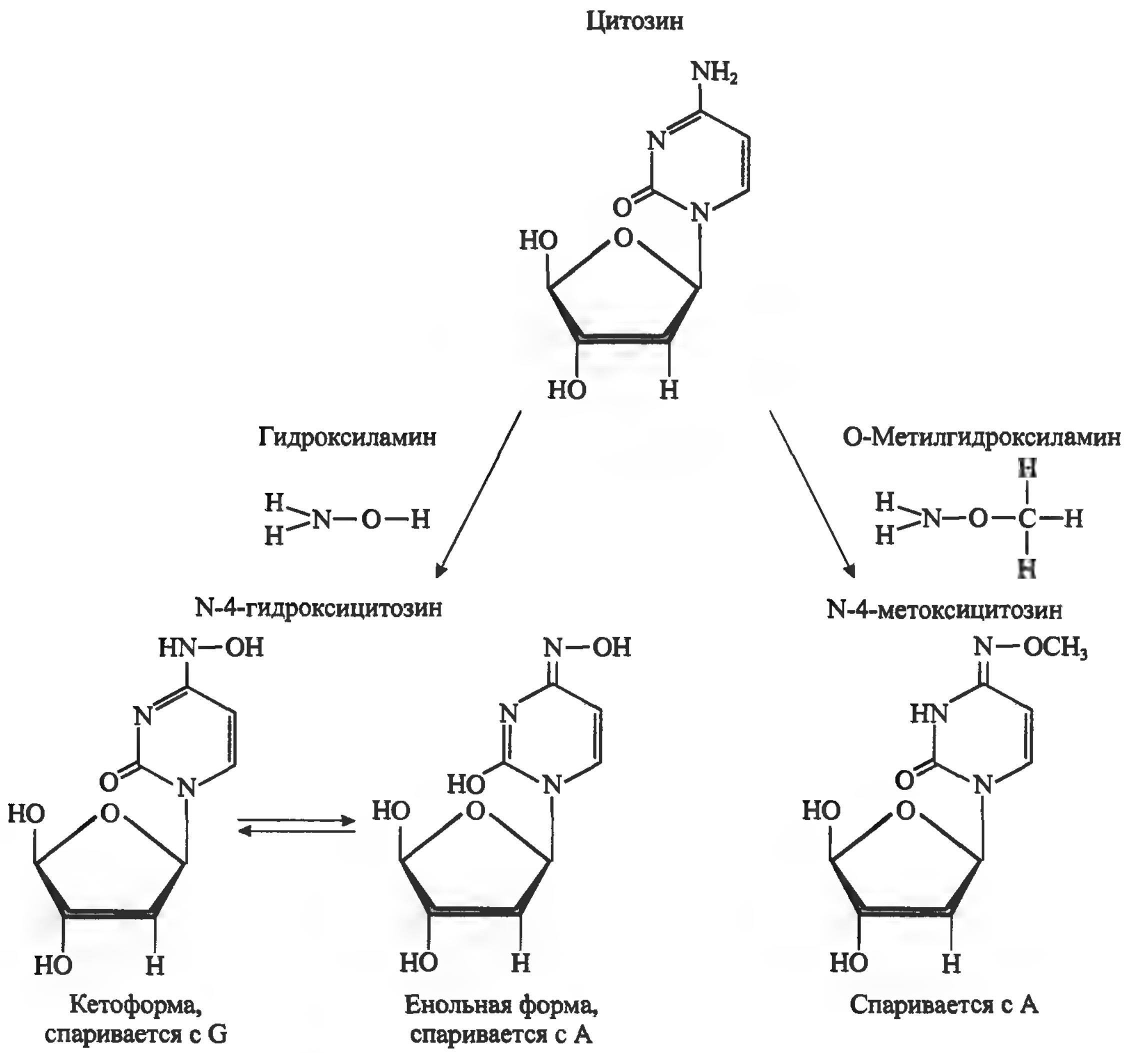


Рис. 6.2. Модификация цитозина гидроксиламином и О-метилгидроксиламином

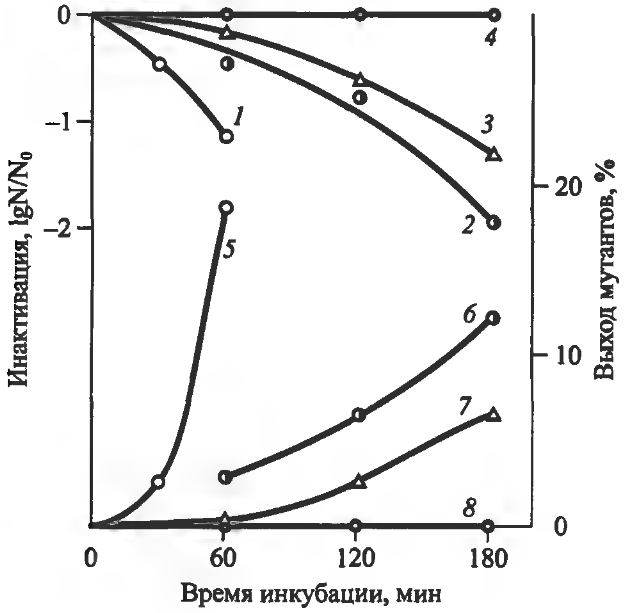


Рис. 6.3. Кинетические кривые инактивации (*1–4*) и мутагенеза по маркеру устойчивости к тетрациклину (*5–8*) плазмиды pBR325 при обработке 1 М ОМГА, pH 5,2 и температуре: 37 °С (*4*, *8*); 50 °С (*3*, *7*); 60 °С (*2*, *6*); 70 °С (*1*, *5*)

ти которых не экранированы соседними. Для кольцевой плазмидной молекулы это возможно лишь в участках локальной денатурации двуспиральной структуры ДНК. Поэтому при мутагенезе плазмид под действием ОМГА *in vitro* большое значение имеет температура инкубации ДНК с реагентом, так как повышение температуры приводит к большей «разрыхленности» структуры двуспиральной кольцевой ДНК плазмиды. Кроме того, на скорость модификации цитозина под действием ОМГА существенное влияние оказывает pH раствора.

В лаборатории С. Н. Щелкунова показали, что при воздействии ОМГА на плазмиду pBR325 (см. рис. 2.9) наибольший уровень мутагенеза при наименьшей инактивации плазмиды достигается при pH раствора, равном 5,2. Данная закономерность соблюдалась для всех трех анализируемых маркеров pBR325: Ap^r, Tc^r, Cm^r. Кроме того, эффективность мутагенеза зависит от температурных условий реакции. Так, при температуре 70 °С имел место высокий уровень мутагенеза pBR325 по гену *tet* (рис. 6.3) при относительно небольшой инактивации плазмиды, в то время как при температуре 37 °С за это же время обработки мутагенез не наблюдался. Полученные результаты демонстрируют, что *in vitro* с высокой эффективностью можно подвергать модификации плазмиды и встроенные в них фрагменты ДНК.

6.3. СЕГМЕНТ-НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ *IN VITRO*

Несомненно, статистический мутагенез плазмидных ДНК методически гораздо проще, чем направленный, и его целесообразно использовать при решении ряда вопросов. При желании мутагенной обработке можно подвергать изолированные фрагменты ДНК и затем вводить их в изучаемый геном. В этом случае будем иметь дело с одним из вариантов сегмент-направленного мутагенеза.

Так, К. Чу с соавторами (1979 г.) обрабатывали гидроксиламином определенные *Eco*RI-фрагменты ДНК вируса простого герпеса и затем вводили их в чувствительные клетки животных одновременно с неповрежденной ДНК вируса дикого типа. Мутагенизированные фрагменты за счет генетической рекомбинации встраивались в вирусный геном, в результате чего были отобраны температурно-чувствительные (ts) мутанты вируса. Причем расположение мутаций было ограничено участками генома, покрываемыми соответствующими *Eco*RI-фрагментами.

Похожие эксперименты выполнили Т. Волкер и М. Шоу (1980 г.), но в данном случае мутагеном обрабатывались целиком гибридные плазмиды, содержащие *Bgl*II-фрагменты генома фага Т4. Затем за счет рекомбинации *in vivo* фрагменты фаговой ДНК встраивались в соответствующие им районы фагового генома. В результате получены мутанты фага по локализованным областям ДНК.

Другой метод сегмент-направленного мутагенеза *in vitro* предложили В. Борриас с соавторами (1976 г.) на примере фага ϕX174. Данный фаг имеет небольшую одноцепочечную кольцевую ДНК, которая при репликации проходит двухцепочечную стадию. Репликативную форму ДНК фага ϕX174 гидролизовали рестриктазой *Hin*dII и после электрофоретического разделения выделили из геля фрагмент, содержащий часть гена *A*. Данный фрагмент обрабатывали 1 М ОМГА при температуре 100 °С в течение 10 мин (денатурация фрагмента ДНК и мутагенез). Модифицированный фрагмент отжигали с одноцепочечной фаговой ДНК и полученным частичным гетеродуплексом трансфицировали чувствительные клетки *E. coli*. При этом использовали ДНК фага, несущего амбер-мутацию по гену *A*. Локус, где расположена данная мутация, покрывается мутагенизированным *Hin*dII-фрагментом. Полученное после трансфекции фаговое потомство титровали на газоне бессупрессорного штамма *E. coli*, на котором не растут амбер-мутанты. Супрессор-независимые варианты фага ϕX174 анализировали на наличие ts-мутаций. В отобранных термочувствительных мутантах выявлялись изменения в районе гибридизации сегмента-мутагена и фаговой ДНК.

Данное направление мутагенеза получило развитие в работах Р. И. Салганика с сотрудниками (1978–1983 гг.). На первом этапе в качестве объекта мутагенного воздействия был взят фаг Т7, имеющий линейную двухцепочечную ДНК. После выделения определенной фаговой мРНК к ней ковалентно присоединяли специальное полифункциональное алкилирующее соединение (рис. 6.4, 6.5), имеющее сокращенное название ТФП. Алифатические алкилирующие группировки ТФП (R_1, R_2) служат для ковалентного присоединения реагента к полинуклеотиду-носителю; ароматическая алкилирующая группировка (R_3) неактивна, так как заторможена соседней формильной группой, однако

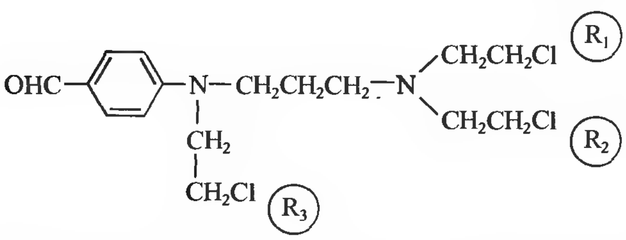


Рис. 6.4. Структура полифункционального мутагена N,N,N'-три-β-хлорэтил-N'-(*п*-формилфенил)-пропилендиамина-1,3 (ТФП)

она может быть в нужный момент активирована восстановлением этой группы боргидридом натрия.

Активацию алкилирующей группировки R_3 проводили после формирования специфичного ДНК–РНК гибрида. В результате данной процедуры удалось эффективно (3–12 %) инактивировать выбранный ген, не затрагивая другие области фагового генома.

Однако использование молекул РНК в качестве носителей алкилирующих групп имеет ряд ограничений. В частности, при этом исключается возможность получения мутаций в нетранскрибируемых районах генома. Кроме того, выделить мРНК, транскрибированные с отдельных генов, в большинстве случаев довольно сложно. С другой стороны, набор известных рестриктаз позволяет получать фрагменты ДНК практически из любого участка изучаемого генома. Решение данной задачи значительно упрощается при использовании ПЦР. Выбранные фрагменты могут быть клонированы и амплифицированы в составе гибридных ДНК. Поэтому было решено заменить мРНК одноцепочечными фрагментами ДНК. На примере мутагенеза гена *tet* плазмиды pBR322, осуществленного по схеме, во многом аналогичной приведенной на рис. 6.5, была показана возможность индукции направленных мутаций с помощью одноцепочечных фрагментов ДНК, несущих алкилирующие группы.

Другой подход к получению направленных мутаций разработан в лаборатории К. Вейссмана (1978 г.). Мутагенного эффекта достигали путем включения в синтезируемую цепь ДНК аналогов нуклеотидов. После репликации *in vivo* за счет измененного спаривания с аналогами получали мутантные последовательности. Наилучший результат наблюдался при включении N-4-гидроксицитозина (N-4-гидрокси dCTP) вместо dTTP. N-4-гидрокси dCTP, как уже указывалось, имеет таутомерную константу (отношение енольной и кето-форм), равную примерно 1, в результате он одинаково хорошо спаривается как с A, так и с G. Включение аналога в двухцепочечную ДНК проводили в реакции ник-трансляции с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli* (рис. 6.6). В качестве объекта исследования авторы взяли кДНК β-глобина кролика, клонированную в составе плазмиды pMB9. Одноцепочечный разрыв по *Eco*RI-участку в составе гена β-глобина вводили с помощью рестриктазы *Eco*RI в присутствии интеркалирующего соединения — бромистого этидия. При этом каждая из цепей ДНК разрывалась примерно с одинаковой частотой, и в результате формировалось два типа молекул с ником в той или иной цепи.

В ходе ограниченной полимеразной реакции (в реакционной смеси отсутствовал dGTP, см. рис. 6.6), инициированной на одноцепочечном разрыве молекулы ДНК, N-4-гидрокси dCTP включался вместо dTTP. После трансформации клеток *E. coli* модифицированной плазмидной ДНК было обнаружено, что около 2 % плазмид утратило участок узнавания рестриктазой *Eco*RI. Семь таких плазмид выделили и секвенировали их в районе *Eco*RI-участка. Оказалось, что три из них имели одиночную замену, три — две замены и одна — три замены. Во всех случаях, как и ожидалось, произошла транзиция TA → CG.

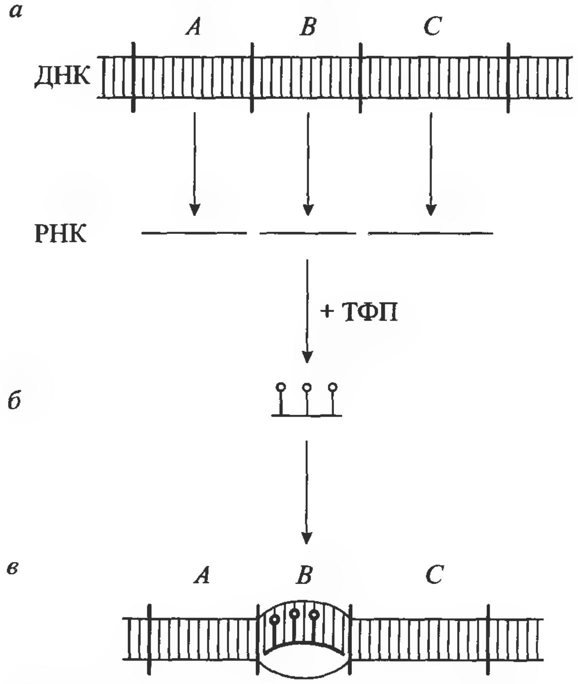


Рис. 6.5. Схема ген-направленного мутагенеза:

а — транскрипция молекул РНК с генов *A*, *B*, *C*; *б* — присоединение высокоэффективных химических групп ТФП к транскрипту гена *B*; *в* — химическая модификация гена *B* после гибридизации ДНК–РНК и удаления формильной группы ТФП при обработке боргидридом натрия

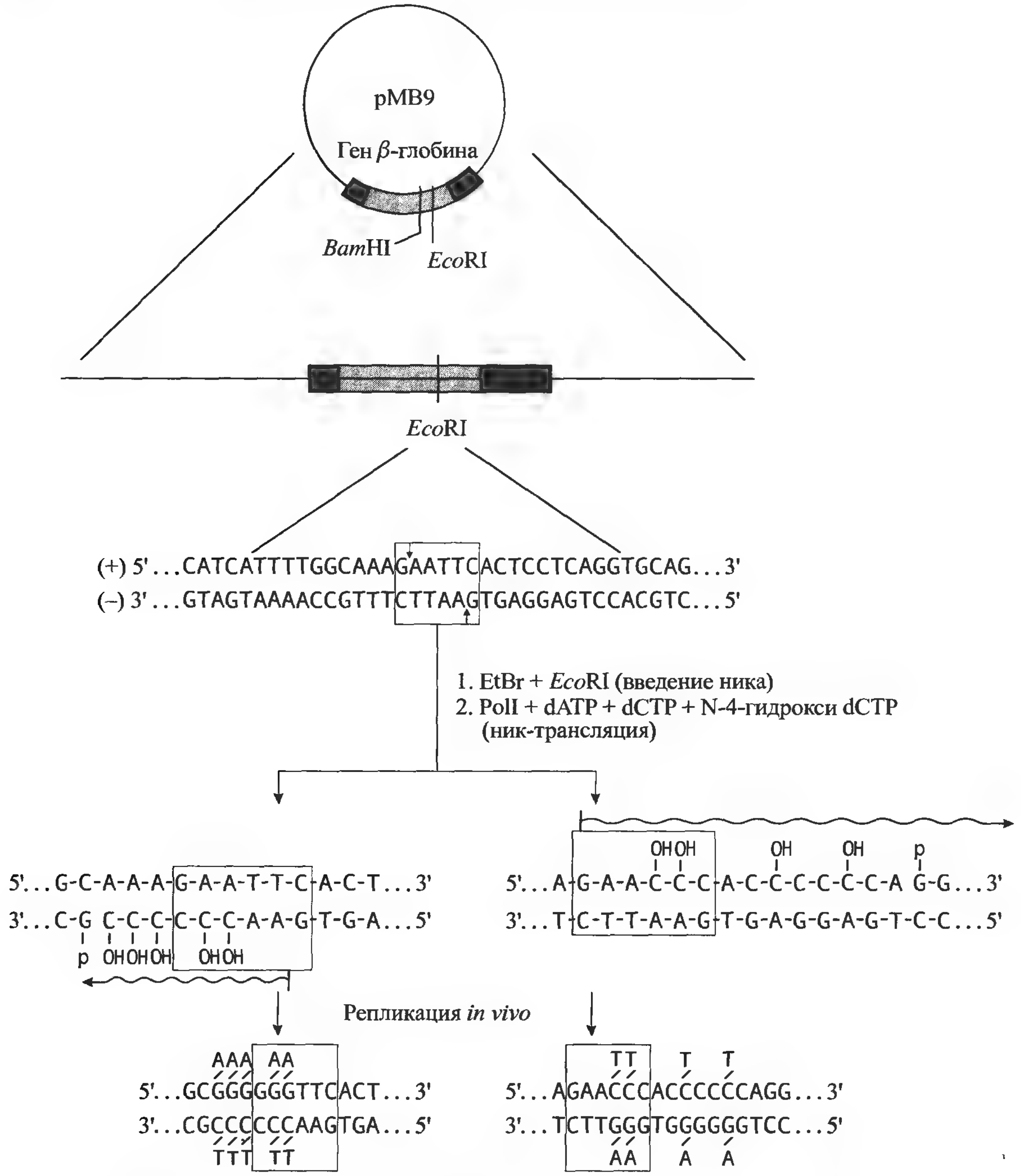


Рис. 6.6. Схема мутагенеза гена β-глобина кролика в районе участка *Eco*RI.

Ник вводится в (+)- или (–)-цепь ДНК в единственном участке *Eco*RI (обведен прямоугольником). Ник-трансляция осуществляется ДНК-полимеразой I *E. coli* в присутствии dATP, dCTP и N-4-гидрокси dCTP вместо dTTP. Отсутствие в смеси dGTP ограничивает район ник-трансляции 13 нуклеотидами на (+)-цепи или 8 на (–)-цепи (волнистые стрелки). Репликация ДНК *in vivo* приводит к транзициям AT → GC в некоторых или во всех точках, указанных в нижней последовательности

Таким образом, данная работа продемонстрировала возможность введения мутаций в заранее выбранный участок изучаемой последовательности ДНК. Однако, как видим, выход мутантов относительно невелик, что может затруднять их отбор при отсутствии методов фенотипического выявления. Долю мутантов, получаемых данным методом, можно увеличить, если в качестве клетки-хозяина для трансформации использовать штамм *E. coli*, дефектный по системе репарации.

Для эффективного сегмент-направленного мутагенеза Д. Натанс с сотрудниками (1978 г.) предложили использовать бисульфит натрия — мутаген, специфичный к одноцепочечным последовательностям ДНК. Этот реагент осуществляет при мягких условиях дезаминирование цитозина, образуя урацил (рис. 6.7). При

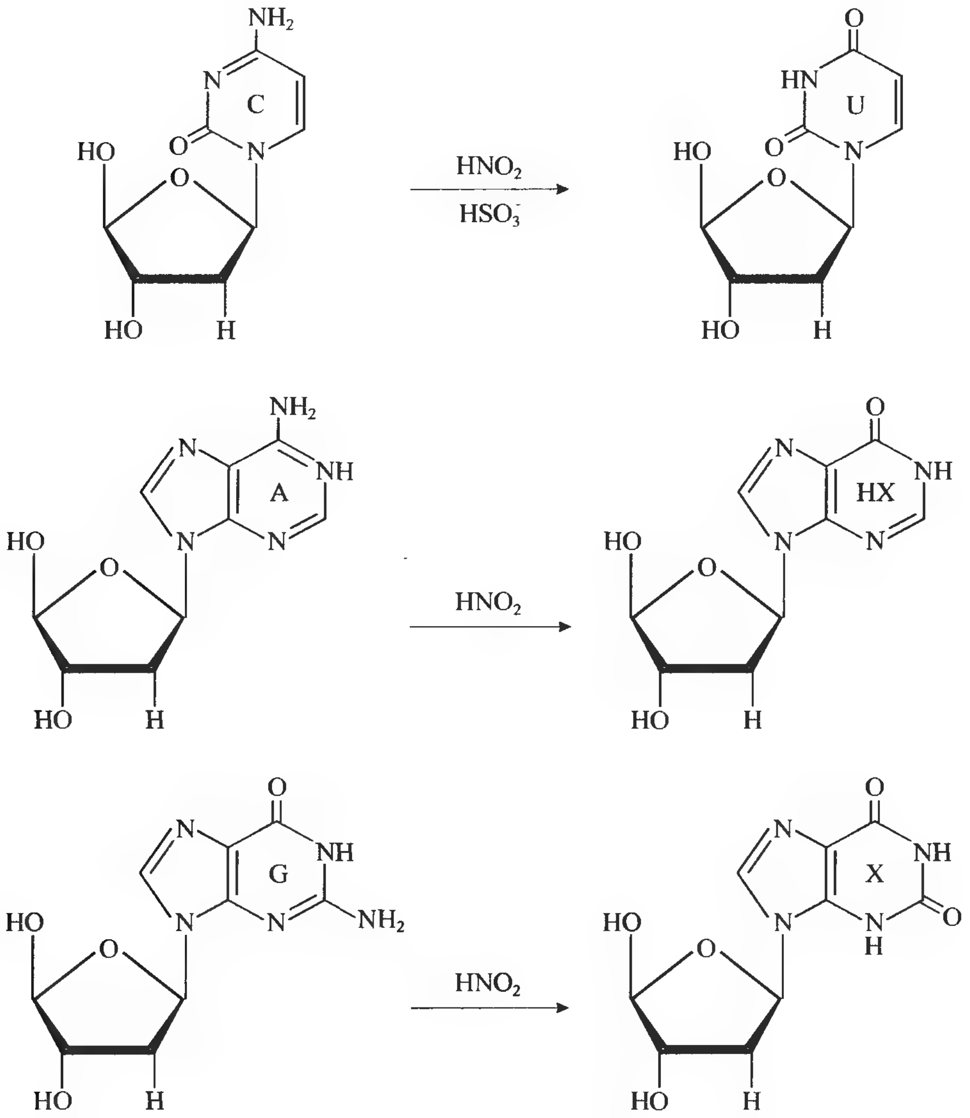


Рис. 6.7. Дезаминирование азотистых оснований при действии на них бисульфита (HSO_3^-) или азотистой кислоты (HNO_2).
С — цитозин; U — урацил; А — аденин; НХ — гипоксантин; G — гуанин; Х — ксантин

этом на двухцепочечной ДНК данная реакция не идет. В качестве субстрата воздействия бисульфита можно использовать либо молекулу ДНК с одноцепочечной брешью, либо гетеродуплексную молекулу с одноцепочечной петлей (рис. 6.8). При полимеразной застройке мутагенизированной бреши или репликации гетеродуплексной молекулы с U спаривается А, и при дальнейшей репликации в клетках *E. coli* формируется потомство мутантных молекул ДНК с транзициями CG → ТА. Выход мутантов при этом может достигать 20 % и более.

При использовании методов включения аналогов нуклеотидов или мутагенеза бисульфитом одноцепочечных брешей (см. рис. 6.6, 6.8) на молекуле двухцепочечной ДНК необходимо специфично осуществлять разрыв одной цепи. В первых экспериментах такого гидролиза добивались с помощью импульсной обработки определенной рестриктазой молекул ДНК в присутствии бромистого этидия, который из-за интеркаляции между цепями ДНК затрудняет расщепление ферментом обеих цепей. Однако такой способ введения ника существенно ограничивает применение этих методов направленного мутагенеза, так как локализация разрыва строго зависит от используемой рестриктазы. Данное затруднение преодолели Д. Шортл с соавторами (1980 г.), которым удалось вводить ник в любой участок кольцевой молекулы ДНК (рис. 6.9). К суперскрученной кольцевой ДНК добавляется одноцепочечный сегмент ДНК, гомологичный последовательности, по которой необходимо ввести ник. Затем к этой смеси добавляют

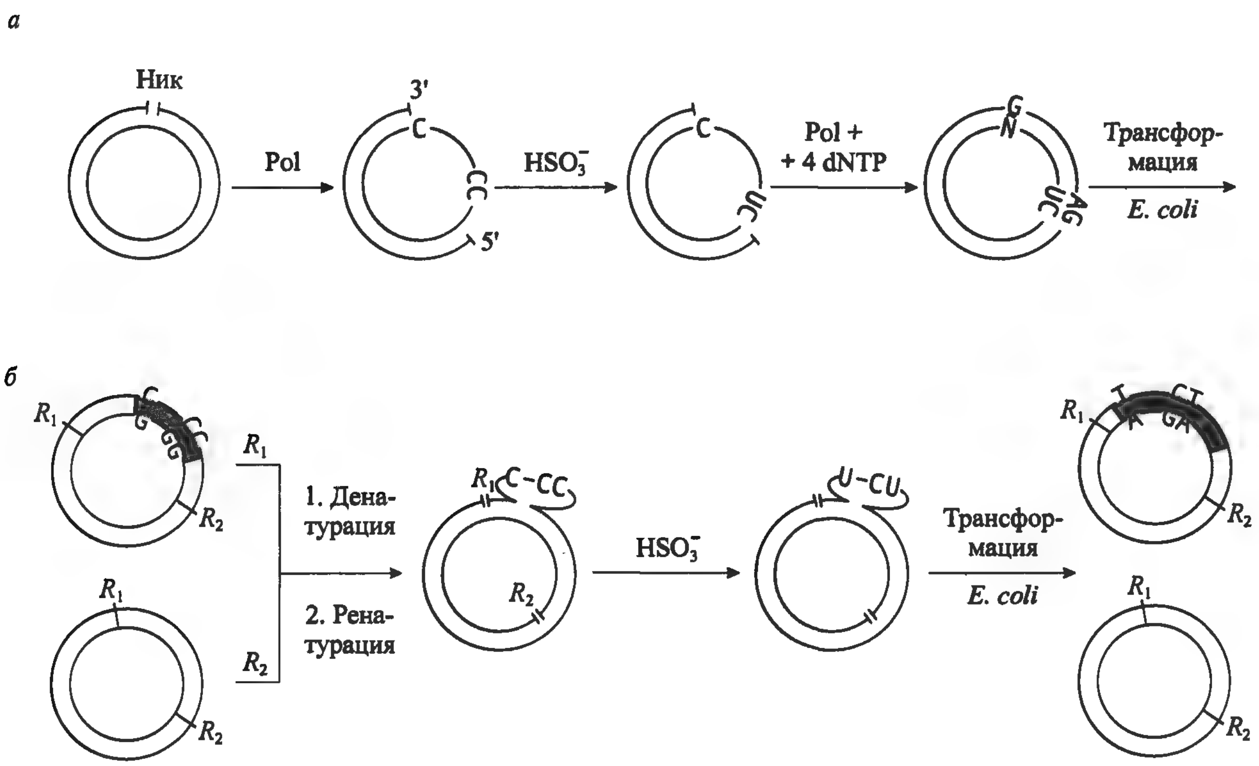


Рис. 6.8. Стратегия направленного мутагенеза
при обработке одноцепочечных участков ДНК бисульфитом натрия:
а — мутагенез по одноцепочечной бреши на молекуле ДНК (Pol — ДНК-полимераза I из *Micrococcus luteus*);
б — мутагенез по одноцепочечной петле на гетеродуплексной молекуле ДНК (R_1, R_2 — рестриктазы)

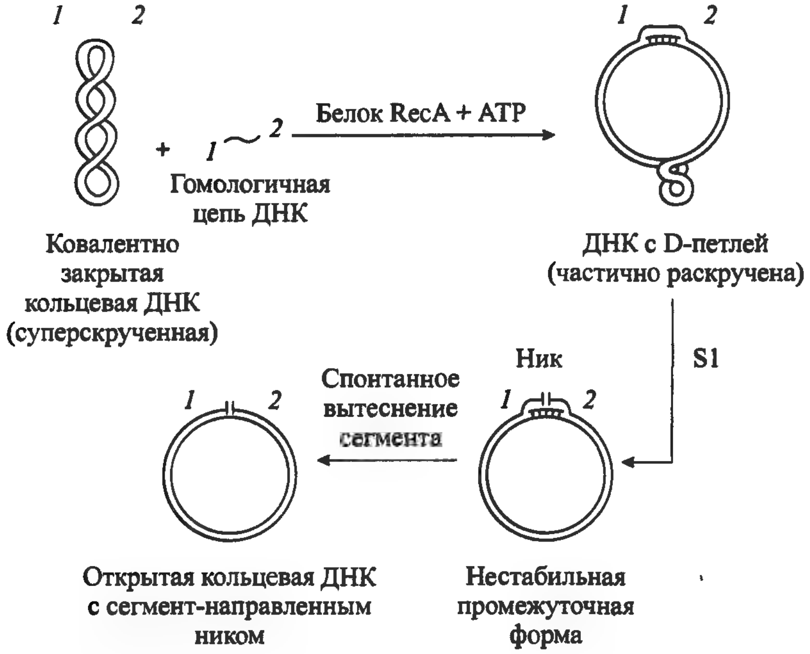


Рис. 6.9. Схема процедуры сегмент-направленного введения ника

белок *E. coli* RecA и ATP. Белок RecA в присутствии ATP катализирует связывание введенного одноцепочечного сегмента ДНК с комплементарной последовательностью на кольцевой суперскрученной ДНК. Образуемая стабильная структура называется D-петлей (от англ. displacement — вытеснение). Если к такому препарату ДНК добавить эндонуклеазу S1, специфичную к одноцепочечной ДНК, то она в D-петле сделает одноцепочечный разрыв с последующим быстрым разрушением D-петли и вытеснением одноцепочечного сегмента. Окончательный продукт реакции представляет собой открытую кольцевую молекулу ДНК с ником в заранее выбранном районе.

Более широкий спектр транзиций, по сравнению с рассмотренными выше мутагенами, дает азотистая кислота. Она дезаминирует цитозин до урацила, аденин до гипоксантина и гуанин до ксантина (см. рис. 6.7). В ДНК спаривание урацила с аденином приводит к транзиции CG → TA. Особенности спаривания гипоксантина таковы, что он может вызывать транзицию AT → GC. Ксантин не обусловливает мутаций. Он является «бессмысленным» основанием, которое не комплементарно обоим пиримидинам, и, следовательно, его появление в молекуле ДНК должно оказывать летальное, а не мутагенное действие.

С. Хирозе с соавторами (1982 г.) предложили использовать азотистую кислоту для эффективного сегмент-направленного мутагенеза. Поскольку HNO_2 может воздействовать и на двухцепочечную ДНК, схема процедуры выглядит следующим образом. С двухцепочечной кольцевой молекулой ДНК, имеющей одноцепочечную брешь, гибридизуют одноцепочечный фрагмент, комплементарный последовательности бреши, который предварительно обработан азотистой кислотой. В полученной гетеродуплексной молекуле оставшиеся бреши достраивают с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* и ковалентно объединяют цепь ДНК в лигазной реакции. После трансформации клеток *E. coli*, дефектных по репарации, анализируют полученные мутанты. Уровень мутагенеза превышает 20 %, при этом выявляются транзиции CG → TA и AT → GC.

Интересный способ сегмент-направленного мутагенеза предложен В. А. Гусевым с соавторами (1981 г.). Он основан на том, что РНК-полимераза в местах своего связывания с ДНК локально расплетает цепи, и на эти участки можно направленно воздействовать мутагенами, специфичными к одноцепочечным участкам ДНК (гидроксиламин и его О-алкил-производные, бисульфит натрия). На примере ДНК фага λ было показано, что таким образом можно направленно вводить мутации по промоторно-операторной области $p_R O_R$ с уровнем мутагенеза около 10 %.

Как видим, сегмент-направленный статистический (случайный) мутагенез можно осуществлять альтернативными методами. Получающийся при этом широкий спектр мутантов позволяет проводить исследование структурно-функциональной организации изучаемого локуса. Недостатки данного подхода состоят в том, что с его помощью сложно получить мутант со строго определенными заменами нуклеотидов и нельзя ввести в ДНК заранее запланированные делеции и вставки. Эти возможности обеспечивает олигонуклеотид-направленный (сайт-специфический) мутагенез.

6.4. ОЛИГОНУКЛЕОТИД-НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ *IN VITRO*

В 1978–1979 гг. С. Джиллам и М. Смит с соавторами экспериментально обосновали возможность использования синтетических олигонуклеотидов в качестве мутагенов (рис. 6.10, *а*). Объектом мутагенеза авторы выбрали фаг ϕX174, имеющий небольшую одноцепочечную кольцевую ДНК, для которой уже была известна последовательность нуклеотидов. Одноцепочечную кольцевую ДНК гибридизовали с синтетическим олигонуклеотидом, имевшим определенные отличия от соответствующей последовательности фагового генома, например точечную замену одного из нуклеотидов. Данный олигонуклеотид использовали в качестве праймера для достройки второй цепи на ДНК-матрице. Эту реакцию осуществляли с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* и ДНК-лигазы. Затем препарат ДНК обрабатывали нуклеазой S1 для гидролиза частично двухцепочечных молекул фаговой ДНК и трансфицировали им сферопласты *E. coli*. В процессе репликации образовывалось смешанное фаговое потомство, состоявшее как из фагов дикого типа, так и из мутантных. Причем мутантная форма составляла около 15 % полученного потомства, хотя теоретически может достигать 50 %.

Для увеличения выхода мутантов С. Джиллам и М. Смит использовали оригинальный метод селекции *in vitro*. Они подобрали условия,

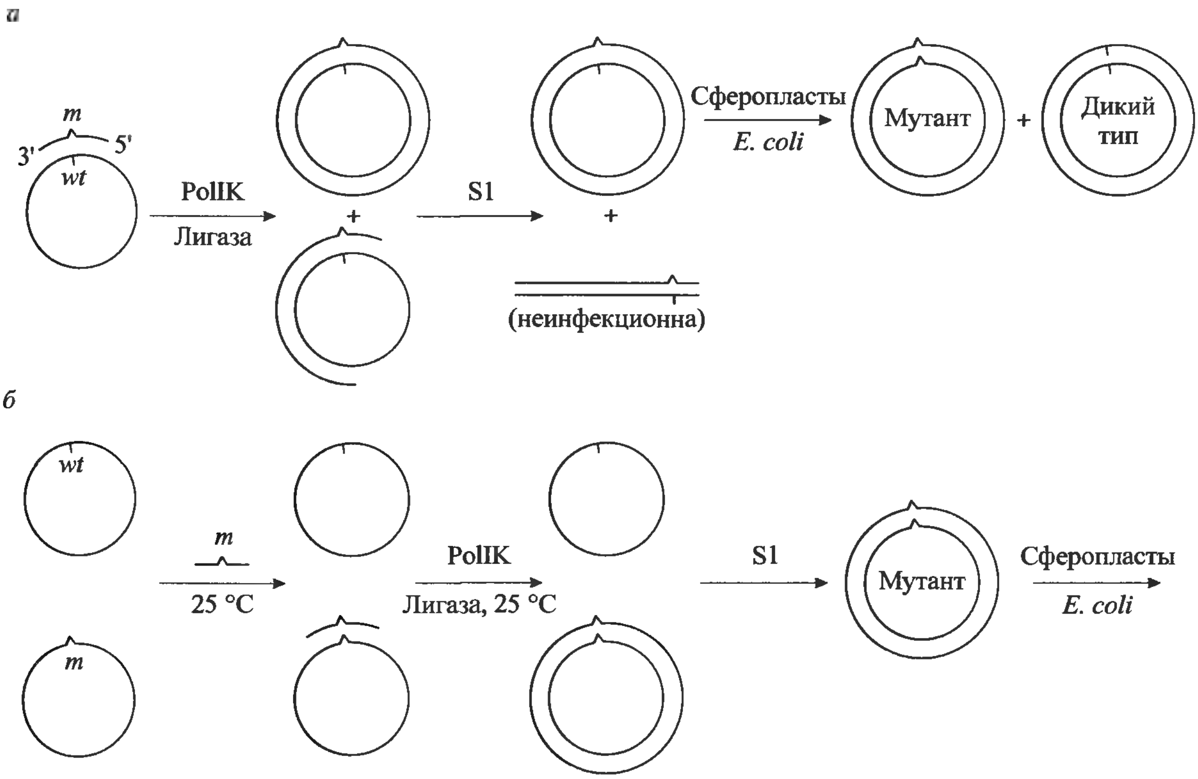


Рис. 6.10. Стратегия введения точковых мутаций в ДНК фага ϕX174 с помощью синтетических не полностью комплементарных олигонуклеотидов (*а*) и селекции *in vitro* мутантных ДНК фага (*б*).

m — мутация, *wt* — дикий тип

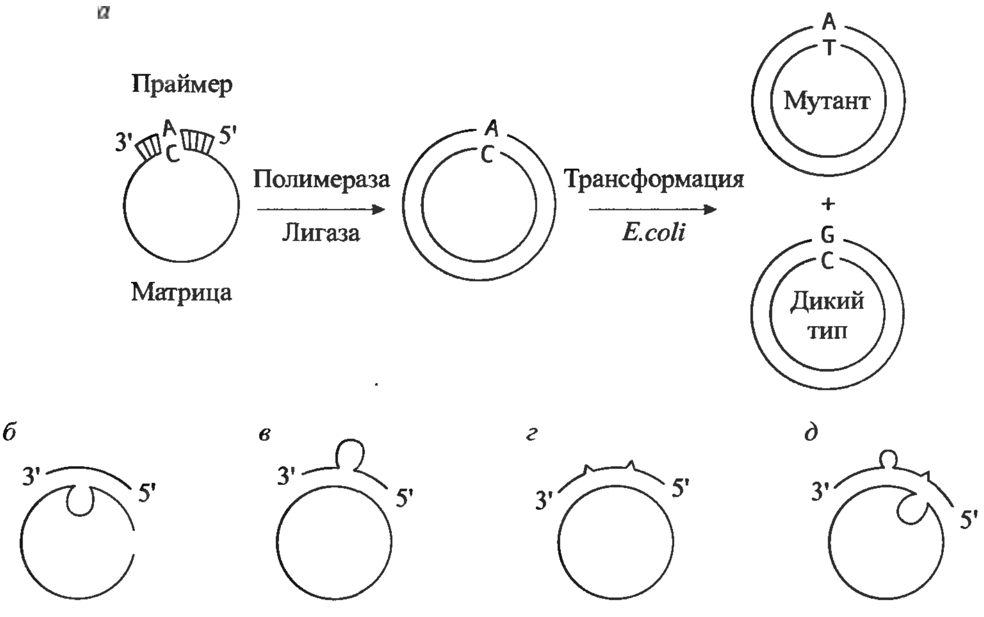


Рис. 6.11. Схема введения олигонуклеотид-направленных мутаций при использовании в качестве матрицы для полимеразной реакции одноцепочечной кольцевой ДНК:

а — введение точковой мутации, *б* — делеции, *в* — вставки, *г* — множественных точковых мутаций, *д* — сложных перестроек

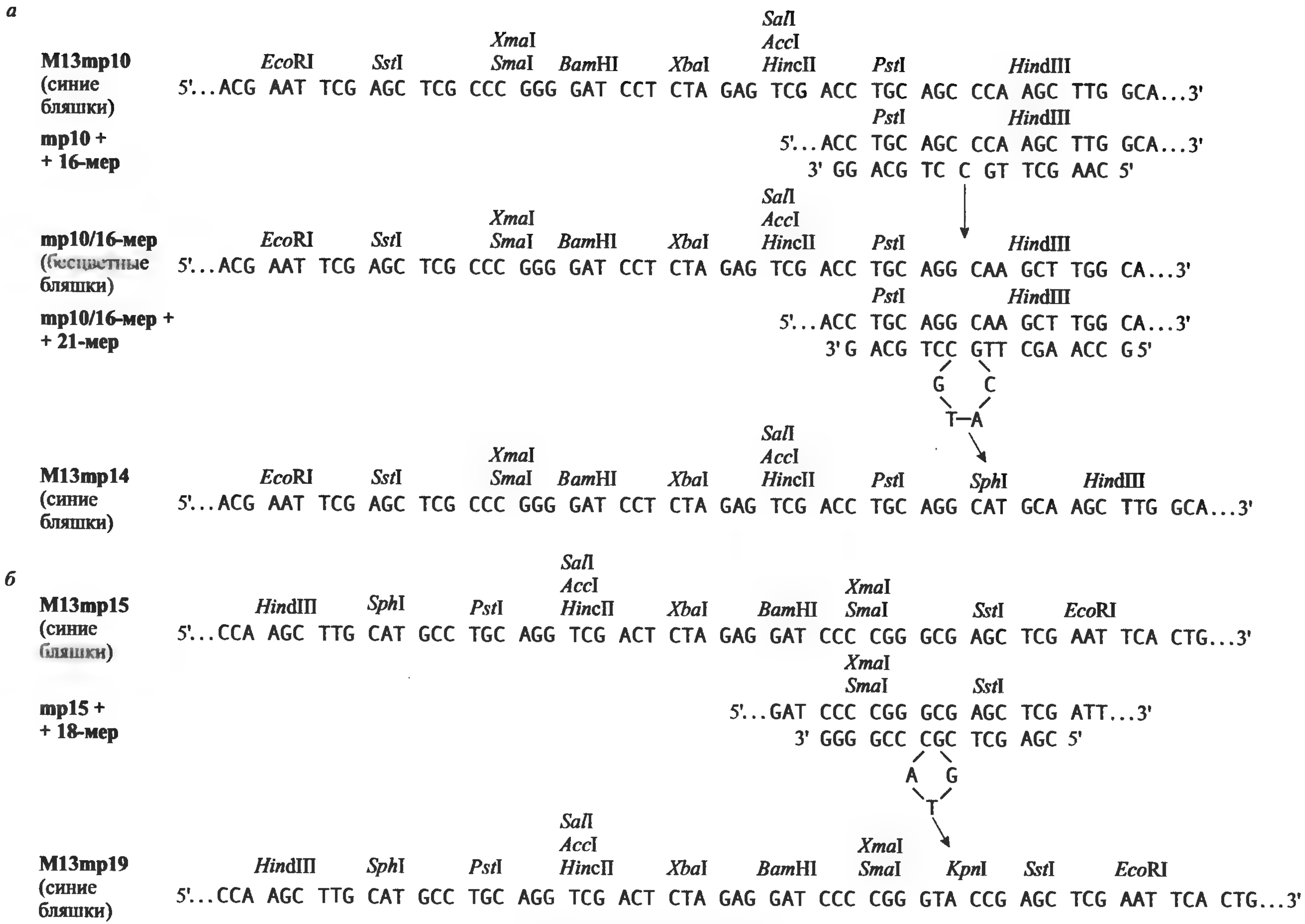


Рис. 6.12. Схема введения с помощью олигонуклеотид-направленного мутагенеза дополнительных участков узнавания рестриктаз в полилинкерную область ДНК векторных фагов серии M13mp:

а — конструирование фага M13mp14; *б* — конструирование фага M13mp19. 16-мер, 21-мер, 18-мер — синтетические олигонуклеотиды соответствующей длины

при которых синтетический олигонуклеотид-мутаген, имеющий точечную замену в последовательности дикого типа, мог гибридизоваться только с мутантной формой фаговой ДНК, но не с ДНК дикого типа (см. рис. 6.10, *б*). После полимеразной реакции и обработки нуклеазой S1 происходило обогащение препарата ДНК мутантными формами. Двух циклов описанной процедуры было достаточно, чтобы выход мутантов повысить практически до 100 %. Анализ условий, необходимых для эффективного связывания с ДНК-матрицей олигонуклеотида, содержащего единичную нуклеотидную замену, и дальнейшего праймирования полимеразной реакции, показал, что в этом случае достаточно двух или трех комплементарных нуклеотидов на 3′-конце и шести или семи — на 5′-конце от некомплементарного нуклеотида. Когда вводятся бо́льшие изменения, размер олигонуклеотида должен быть увеличен.

Разработанный на модельной системе фага *ф*X174 метод олигонуклеотид-направленного мутагенеза получил дальнейшее развитие на других типах молекул ДНК, прежде всего на ДНК нитевидных фагов и плазмидах. У плазмид приходится получать одноцепочечные кольцевые формы при определенных ферментных обработках двухцепочечной ДНК *in vitro*, что обычно осуществить не очень просто. Поэтому наиболее широко используют нитевидные фаги, и в первую очередь фаг M13. На кольцевой одноцепочечной ДНК фага M13 удобно достраивать вторую цепь. Кроме того, создана серия векторных молекул на основе ДНК фага M13, и данный фаг с успехом используется при секвенировании клонированных последовательностей ДНК методом Сэнгера.

Пионерские работы по олигонуклеотид-направленному мутагенезу фага M13 и гибридов на его основе провели Дж. Мессинг с сотрудниками (1981–1983 гг.). Они продемонстрировали возможность вводить в геном фага с помощью олигонуклеотидов направленные замены, вставки, делеции (рис. 6.11). Таким путем, в частности, получены новые векторные производные серии M13mp (рис. 6.12). Важной особенностью данного метода является то, что олигонуклеотид-мутаген может быть использован для эффективного отбора получаемых мутантных клонов. С этой целью выросшие после трансфекции клоны ДНК гибридизуют на нитроцеллюлозе с ^{32}P-меченным синтетическим олигонуклеотидом-мутагеном при низкой температуре, а затем осуществляют последовательные отмывки радиоактивного зонда при повышении температуры с интервалом в 5 °С, радиоавтографируя фильтр после каждой обработки. В результате таких процедур можно подобрать условия, когда радиоактивно меченный олигонуклеотид будет гибридизоваться только с полностью комплементарной (мутантной) последовательностью, но не с ДНК, имеющей отличие хотя бы по одному нуклеотиду (дикий тип). Данный методический прием очень широко используют при введении направленных мутаций и отборе целевых вариантов.

Недостатком классического варианта олигонуклеотид-направленного мутагенеза ДНК фага M13 являлось то, что выход гибридов обычно не превышал 5 %. Поэтому требовалось подобрать условия, которые позволили бы приблизиться к уровню 50 %, а может быть, и превысить его.

ДНК-полимераза I является прежде всего ферментом, репарирующим повреждения в структуре ДНК, и поэтому она с определенной частотой может «исправлять» синтетический олигонуклеотид-мутаген. В связи с этим в полимеразной реакции используют фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I, причем желательно брать фермент, полученный генно-инженер-

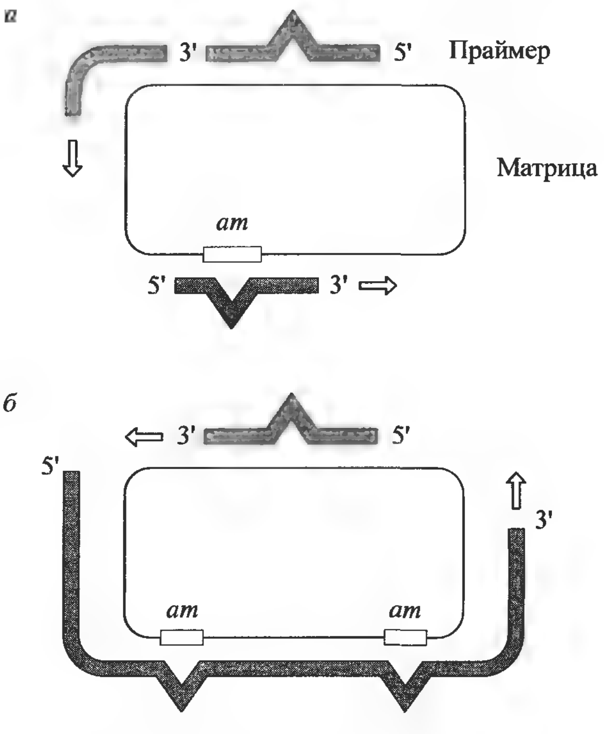


Рис. 6.13. Стратегия полимеразной достройки второй цепи:

а — на одноцепочечной ДНК с применением двойного праймирования;
б — на двухцепочечной ДНК с одноцепочечной брешью. Показан также принцип амбер-селекции цепей ДНК для выявления молекул ДНК с целевыми мутациями

Таблица 6.1. **Выход (%) олигонуклеотид-направленных мутантов фага M13 в зависимости от генотипа штаммов *E. coli*, используемых для трансфекции**

Фаг, подвергаемый мутагенезу	TG1 (Rep^+ $Su2^+$)	HB2151 (Rep^+ $Su2^-$)	BMH71-18mutL[1] (Rep^- $Su2^+$)	HB21154[1] (Rep^- $Su2^-$)
M13mp93	3,5	5	29	37
M13mp93*am*IV	4,5	37,5	32	70

[1] Штамм дефектен по системе репарации.

ным способом (через суперпродукцию клонированного укороченного гена PolI), а не гидролизом природной ДНК-полимеразы, так как первый препарат имеет значительно меньше

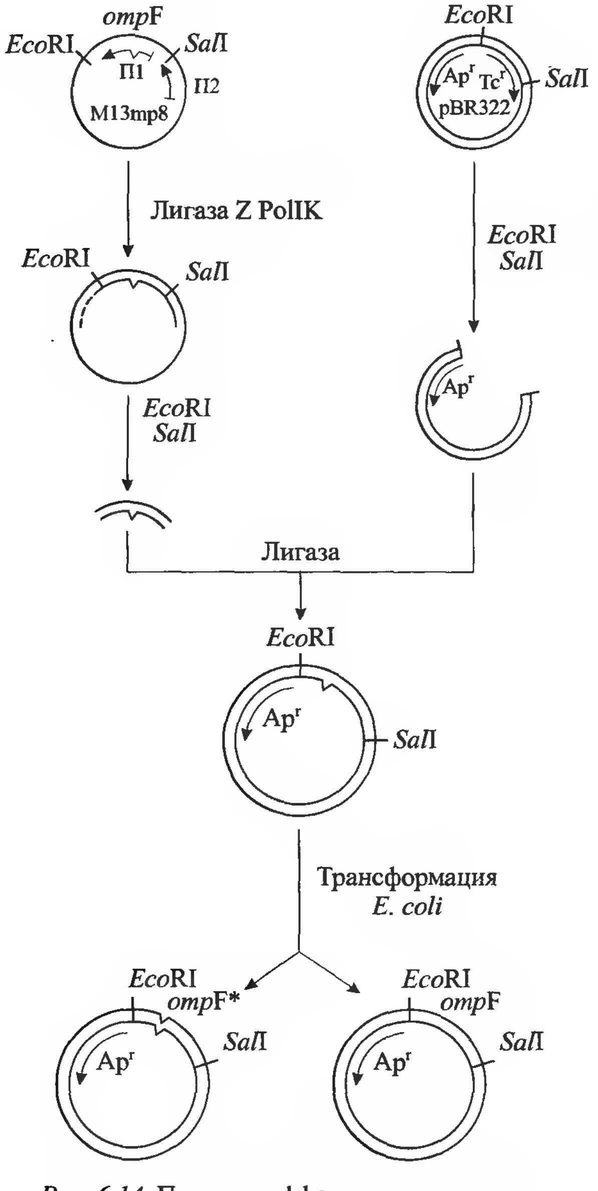


Рис. 6.14. Принцип эффективного введения олигонуклеотид-направленных мутаций в изучаемый клонированный ген.

П1 — праймер-мутаген;
П2 — дополнительный праймер;
*omp*F — ген дикого типа; *omp*F* — мутантный ген

посторонних нуклеазных примесей, в том числе и PolI.

Короткие олигонуклеотиды весьма чувствительны к действию разных нуклеаз, а также экзонуклеазных активностей ДНК-полимеразы I *E. coli*, поэтому возникает проблема защиты синтетических олигонуклеотидов-мутагенов. В лаборатории В. А. Петренко предложили вместо обычных олигодезоксирибонуклеотидов использовать их неприродные фосфотриэфирные аналоги. Показано, что они сохраняют способность специфически связываться с комплементарными участками ДНК и служить праймерами в ДНК-полимеразной реакции. Применение триэфирных аналогов олигонуклеотидов позволило в ряде случаев поднять уровень мутагенеза с 1–2 до 10 %. При этом можно было использовать природную форму ДНК-полимеразы I.

PolI осуществляет синтез второй цепи ДНК не очень эффективно, поэтому полностью достроенные двухцепочечные ДНК фага M13 образуются с невысокой частотой. Ряд авторов предложили применять двойное праймирование или использовать кольцевую двухцепочечную ДНК с одноцепочечной брешью (рис. 6.13). В этом случае полностью двухцепочечные молекулы ДНК получаются с заметно большей эффективностью.

Дж. Крамер с сотрудниками показали, что выход целевых мутантов значительно увеличивается при использовании штаммов *E. coli*, дефектных по системе репарации. П. Картер с соавторами (1985 г.), учтя опыт предшественников, предложили метод амбер-селекции цепей ДНК. В качестве матрицы берется ДНК фага M13 с амбер-мутацией в районе, который не планируется подвергать мутагенезу (см. рис. 6.13). Наряду с олигонуклеотидом-мутагеном к такой ДНК добавляют второй праймер (синтетический или природный одноцепочечный фрагмент ДНК), комплементарный участку с амбер-мутацией, но имеющий последовательность дикого типа в этом локусе. Таким образом формируется система двойного праймирования. После завершения полимеразной реакции и лигирова-

ния полученным препаратом ДНК трансфицируют клетки штамма *E. coli*, не супрессирующего амбер-мутации и дефектного по системе репарации. В таких условиях *in vivo* будет происходить селекция молекул ДНК без амбер-мутаций. Данный метод позволяет повысить выход целевых мутантов до 70 % (табл. 6.1).

К. Норрис с соавторами разработали другую схему, позволяющую преодолеть затруднения с полной достройкой второй цепи ДНК (рис. 6.14). Для этого используют два праймера, один из которых — мутаген, но полимеразно-лигазную реакцию не ведут до конца. Из частично двухцепочечной кольцевой молекулы ДНК с помощью рестриктаз выщепляют подвергаемый мутагенезу двухцепочечный фрагмент и клонируют его в векторной плазмиде. В результате уровень мутантов по гену *ompF* (белок внешней мембраны *E. coli*) достигал 42 % проанализированных клонов трансформантов *E. coli*.

Существенно упростить метод олигонуклеотид-направленного мутагенеза и повысить его эффективность удалось Н. Тсурушита с соавторами (1988 г.). Вместо фермента репарации PolI они применили фермент PolIII, ответственный за репликацию хромосомной ДНК *E. coli*. Данный фермент обеспечивает высокую скорость синтеза второй цепи ДНК *in vitro* (около 500 нуклеотидов в секунду). Так, на одноцепочечной ДНК фага M13, гибридизованной с праймером, PolIII способна нарастить вторую цепь менее чем за 20 с. С использованием PolIII выход мутантов приближается к 50 % и при этом не требуется ДНК-лигаза.

Блестящие успехи в разработке методов химического синтеза олигонуклеотидов, доступность высокоочищенных ферментов нуклеинового обмена привели к тому, что процедуры сайтспецифического мутагенеза могут при необходимости применяться в любой молекулярно-биологической лаборатории. Данные методы стали неотъемлемой частью исследований, направленных на изучение структурно-функциональной организации генов и белков. Некоторые из этих работ рассмотрим в следующей главе.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Ауэрбах Ш. Проблемы мутагенеза. М.: Мир, 1978. 463 с.

Гусев В. А., Каргинов В. А., Кравченко В. В. и др. Модификация операторно-промоторного участка ДНК фага лямбда в составе специфического комплекса с РНК-полимеразой *Escherichia coli* // Докл. АН СССР. 1981. Т. 260. С. 753–756.

Мазин А. В., Дианов Г. Л., Овчинникова Л. П., Салганик Р. И. Индукция направленных мутаций в гене устойчивости к тетрациклину плазмиды pBR322 с помощью комплементарных однонитевых фрагментов ДНК, несущих алкилирующие группы // Докл. АН СССР. 1983. Т. 268. С. 979–982.

Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. 436 с.

Петренко В. А., Поздняков П. И., Киприянов С. М. и др. Сайт-локализованный мутагенез, направляемый фосфотриэфирными аналогами олигонуклеотидов // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. С. 1088–1100.

Рязанкина О. И., Попова Т. Г., Щелкунов С. Н. Химический мутагенез плазмид *in vitro* // Микробиологические исследования в Западной Сибири. Новосибирск: Наука, 1989. С. 11–14.

Салганик Р. И., Дианов Г. Л., Курбатов В. А. и др. Направленное воздействие на геном бактериофага T7 с помощью транскрипта области ранних генов, несущего множественные алкилирующие группы // Докл. АН СССР. 1978. Т. 239. С. 217–220.

Borrias W. E., Wilschut I. J. C., Vereijken J. M. et al. Induction and isolation of mutants in a specific region of gene A of bacteriophage ϕX174 // Virology. 1976. Vol. 70. P. 195–197.

Carter P. Site-directed mutagenesis // Biochem. J. 1986. Vol. 237. P. 1–7.

Chu C. T., Parris D. S., Dixon R. A. F. et al. Hydroxylamine mutagenesis of HSV DNA and DNA fragments: Introduction of mutations into selected regions of the viral genome // Virology. 1979. Vol. 98. P. 168–181.

Gillam S., Smith M. Site-specific mutagenesis using synthetic oligodeoxyribonucleotide primers: I. Optimum conditions and minimum oligodeoxyribonucleotide length // Gene. 1979. Vol. 8. P. 81–97.

Gillam S., Smith M. Site-specific mutagenesis using synthetic oligodeoxyribonucleotide primers: II. *In vitro* selection of mutant DNA // Gene. 1979. Vol. 8. P. 99–106.

Hirose S., Takeuchi K., Suzuki Y. *In vitro* characterization of the fibroin gene promoter by the use of single-base substitution mutants // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. Vol. 79. P. 7258–7262.

Hutchison C. A., Phillips S., Edgell M. N. et al. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence // J. Biol. Chem. 1978. Vol. 253. P. 6551–6560.

Messing J. M13mp2 and derivatives: A molecular cloning system for DNA sequencing, strand specific hybridization, and *in vitro* mutagenesis // Recombinant DNA: Proc. of Third Cleveland Symposium on Macromolecules. Amsterdam: Elsevier, 1981. P. 143–153.

Muller W., Weber H., Meyer F., Weissmann C. Site-directed mutagenesis in DNA: generation of point mutations in cloned β-globin complementary DNA at the positions corresponding to amino acids 121 to 123 // J. Mol. Biol. 1978. Vol. 124. P. 343–358.

Munson L., Mandecki W., Caruthers M. H., Reznikoff W. Oligonucleotide mutagenesis of the *lac*P*UV*5 promoter // Nucl. Acids Res. 1984. Vol. 12. P. 4011–4017.

Norrander J., Kempe T., Messing J. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis // Gene. 1983. Vol. 26. P. 101–106.

Norris K., Norris F., Christiansen L., Fiil N. Efficient site-directed mutagenesis by simultaneous use of two primers // Nucl. Acids Res. 1983. Vol. 11. P. 5103–5112.

Peden K. W. C., Nathans D. Local mutagenesis within deletion loops of DNA heteroduplexes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. Vol. 79. P. 7214–7217.

Salganik R. I., Dianov G. L., Ovchinnikova L. P. et al. Gene-directed mutagenesis in bacteriophage T7 provided by polyalkylating RNAs complementary to select DNA sites // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. Vol. 77. P. 2796–2800.

Shortle D., DiMaio D., Nathans D. Directed mutagenesis // Ann. Rev. Genet. 1981. Vol. 15. P. 265–294.

Shortle D., Nathans D. Local mutagenesis: a method for generating viral mutants with base substitutions in preselected regions of the viral genome // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. Vol. 75. P. 2170–2174.

Smith M. Site-directed mutagenesis // Phil. Trans. R. Soc. Lond. 1986. Vol. 317. P. 295–304.

Tsurushita N., Maki H., Korn L. J. Site-directed mutagenesis with *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme // Gene. 1988. Vol. 62. P. 135–139.

Volker T. A., Showe M. K. Induction of mutations in specific genes of bacteriophage T4 using cloned restriction fragments and marker rescue // Mol. Gen. Genet. 1980. Vol. 177. P. 447–452.

Warburton N., Boseley P. G., Porter A. G. Increased expression of a cloned gene by local mutagenesis of its promoter and ribosome binding site // Nucl. Acids Res. 1983. Vol. 11. P. 5837–5854.

Глава 7
БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Благодаря разработке и совершенствованию методов клонирования и идентификации генов, секвенирования последовательностей ДНК, химического синтеза олигонуклеотидов, направленного мутагенеза молекул ДНК *in vitro* и оптимизации экспрессии целевых генов в клетках *E. coli* появилась возможность создавать мутантные формы генов и нарабатывать в достаточных для анализа количествах соответствующие им измененные варианты изучаемых белков. В целом направление исследований по конструированию методами генетической инженерии белков с измененными по отношению к природному прототипу свойствами, химерных белков, обладающих свойствами двух или более отдельных белков, и т. п., т. е. создание «неприродных» вариантов белков и изучение их свойств, получило название «белковая инженерия».

Несомненно, успех лучших работ по белковой инженерии обусловлен совмещением высокоинтеллектуального анализа трехмерной структуры белка, на основании которого определяется стратегия введения изменений в последовательность аминокислот, и экспериментов по запланированной реконструкции гена, требующих высокой квалификации исследователя. Накопление данных о первичной структуре белков (в подавляющем большинстве случаев полученных на основе секвенирования генов), кристаллографических данных о трехмерной структуре, развитие методов моделирования конформации белков по их аминокислотной последовательности позволяет со все большей определенностью создавать новые формы изучаемых белков.

В последние годы методы белковой инженерии используются довольно широко. Рассмотрим некоторые работы, дающие представление об огромных возможностях данного направления молекулярной биологии.

7.1. ПОЛУЧЕНИЕ НОВЫХ ФОРМ БЕЛКОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИД-НАПРАВЛЕННЫМ МУТАГЕНЕЗОМ

В 1984 г. А. Вилкинсон с соавторами впервые продемонстрировали, что введение в результате направленного мутагенеза единичной аминокислотной замены может привести к значительному изменению свойств фермента. Они экспериментировали с клонированным в *E. coli* геном тирозил-тРНК-синтетазы (TyrTS) бактерии *Bacillus stearothermophilus*. TyrTS катализирует аминоацилирование тРНК^{Tyr} по двухступенчатому механизму: тирозин активируется, образуя фермент-связанный тирозиладенилат, и затем переносится на тРНК^{Tyr}. Для данного фермента была известна кристаллографическая модель. Установлено, что он взаимодействует с тирозиладенилатом через образование в активном центре водородных связей между боковыми группами аминокислотных остатков Cys35, Thr51, His48 и остатком рибозы. Путем олигонуклеотид-направленного мутагенеза соответствующие триплеты заменяли, а мутантные гены экспрессировали в *E. coli*. Каждую мутантную форму TyrTS выделяли из клеток *E. coli* и анализировали ее ферментативную активность.

При замене Cys35 на Gly35 или Ser35 фермент имел сниженное сродство к АТР. Замена Thr51 на Ala51 приводила к небольшому увеличению энергии фермент-субстратного взаимодействия, а при замене Thr51 на Pro51 сродство тирозил-тРНК-синтетазы к субстрату АТР увеличивалось на два порядка (!), что обеспечивало 25-кратное повышение удельной активности фермента.

Другая изящная работа была выполнена Л. Пэрри и Р. Уэтзелом (1984 г.). В качестве

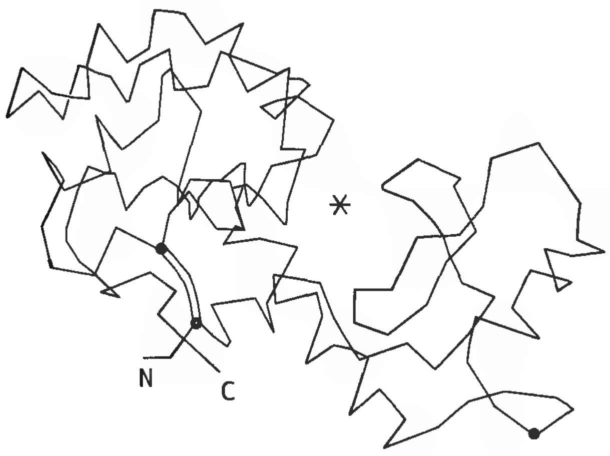


Рис. 7.1. Компьютерно-графическое изображение цепи α-углеродов лизоцима фага Т4.

N и C — соответственно N- и C-концы белка; звездочка — активный центр фермента; черные кружки — цистеин (в положении 3 от N-конца — искусственно введенный цистеин); двойная линия — планируемая дисульфидная связь

объекта исследования они выбрали лизоцим фага Т4. Для этого белка была известна кристаллографическая модель и показано, что имеющиеся в нем два остатка цистеина не образуют дисульфидную связь. Кроме того, данный фермент быстро инактивируется при нагревании. Авторы исходили из положения, что в глобулярных белках дисульфидные связи обеспечивают конформационную стабильность. Поэтому было решено ввести в лизоцим фага Т4 дисульфидную связь, которая не нарушала бы структуру активного центра фермента, но стабилизировала бы его конформацию. Используя компьютерную графику (рис. 7.1) и теоретические расчеты, пришли к заключению, что оптимальным вариантом является введение дисульфидной связи между имеющимся в белке Cys97 и Cys, который необходимо ввести в положение 3. Олигонуклеотид-направленным мутагенезом в ген лизоцима, находящийся в составе M13mp10, ввели мутацию, обусловившую замену Ile3 на Cys3. Мутантный ген экспрессировали в клетках *E. coli* под контролем индуцибельного промотора p_{tac} (см. рис. 3.2). Лизоцим из клеток выделяли и изучали его свойства.

В присутствии восстановителя β-меркаптоэтанола, вызывающего разрушение дисульфидных связей, лизоцим (Ile3 → Cys3) при электрофорезе в полиакриламидном геле обладал такой же подвижностью, как и немутантная форма фермента. После обработки окислителем тетратионатом натрия, вызывающим образование дисульфидных связей, мутантный лизоцизм мигрировал при электрофорезе с большой скоростью. Было показано, что ни замена Ile3 на Cys3, ни образование дисульфидной связи между Cys3 и Cys97 не оказывает сколько-нибудь заметного эффекта на ферментативную активность лизоцима фага Т4. При этом мутантный лизоцим с дисульфидной связью приобретал высокую термостабильность. Инкубация при температуре 67 °C в течение 3 ч уменьшала активность мутантной формы не более чем на 50 %, в то время как у природного фермента в этих же условиях сохранялось лишь 0,2 % исходной активности (рис. 7.2, *а*). Разрыв дисульфидной связи лизоцима (Ile3 → Cys3) приводил к утрате термостабильности фермента (см. рис. 7.2, *б*). Как видим, единичная аминокислотная замена, не влияя на активность фермента, может значительно стабилизировать его конформацию.

Дж. Вэллс с соавторами (1985 г.) разработали процедуру, названную ими ***кассетным мутаге-***

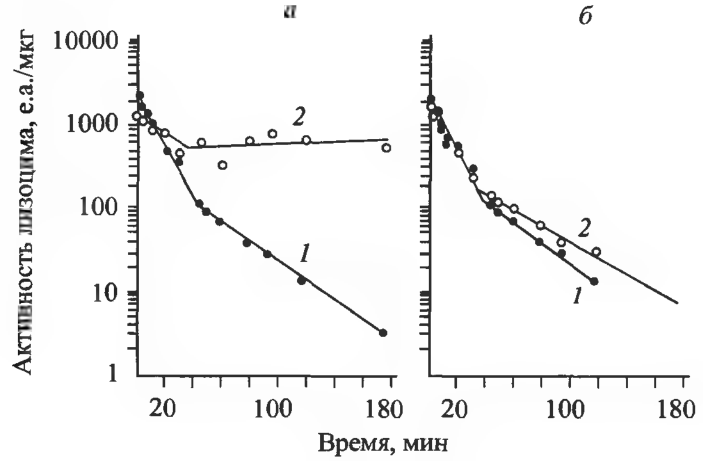


Рис. 7.2. Кинетика температурной инактивации разных форм лизоцима фага Т4:

а — белки после инкубации с тетратионатом натрия, *б* — с β-меркаптоэтанолом; *1* — лизоцим дикого типа; *2* — мутантная форма лизоцима (Ile3 → Cys3)

незом. В непосредственной близости от предполагаемого места введения мутации с 5'- и 3'-стороны олигонуклеотид-направленным мутагенезом в целевую последовательность, находящуюся в составе ДНК фага M13, вводят участки узнавания рестриктаз R_1 и R_2, которые отсутствуют на экспрессирующем плазмидном векторе. После такого мутагенеза ген из ДНК фага M13 перестраивают в экспрессирующую плазмиду. Затем полученную плазмиду гидролизуют R_1 и R_2 и добавляют к ней смесь синтетических двухцепочечных сегментов, которые после встройки восстанавливают последовательность гена, за исключением триплета, кодирующего определенную аминокислоту. После трансформации клеток *E. coli* секвенированием независимых клонов идентифицируют плазмиды, содержащие разные замены целевого триплета.

Данный подход использован для введения сайт-направленных мутаций в ген субтилизина *Bacillus subtilis*. Было известно, что субтилизин легко инактивируется при химическом окислении и первичным местом такой инактивации является Met222. Путем кассетного мутагенеза получили 19 вариантов субтилизина, у которых Met222 был последовательно замещен всеми другими аминокислотами, используемыми при синтезе белков *in vivo*. Все 20 форм субтилизина нарабатывали, используя вектор экспрессии, в клетках *B. subtilis* и изучали свойства полученных вариантов этого белка. Оказалось, что единичная замена Met222 на другие аминокислоты приводит к вариациям в ферментативной активности от 0, 3 до 138 % от уровня удельной активности нативного фермента:

Cys	138	Phe	4,9
Ala	53	Trp	4,8
Ser	35	Asp	4,1
Gly	30	Tyr	4,0
Thr	28	His	4,0
Asn	15	Glu	3,6
Pro	13	Ile	2,2
Leu	12	Arg	0,5
Val	9,3	Lys	0,3
Gln	7,2		

Замена Met222 на Ala, Ser или Cys значительно повышает устойчивость субтилизина к воздействию химических окислителей.

Таким образом, методом олигонуклеотид-направленного мутагенеза можно создавать ферменты, имеющие повышенную термостабильность или/и устойчивость к окислительной инактивации, а также повышенную удельную активность. Придание таких свойств ферментам имеет особое значение для промышленных процессов, в которых они применяются.

Чрезвычайно интересной областью исследований является создание методами направленного мутагенеза белков, имеющих измененную специфичность взаимодействия с другими макромолекулами. Показательна в этом плане работа М. Куртни с соавторами, которые осуществили сайтспецифический мутагенез гена α_1-антитрипсина (α_1AT). Данный белок представляет собой ингибитор нейтрофильной эластазы — протеазы, способной гидролизовать большинство компонентов соединительной ткани. Как и другие ингибиторы, он играет роль субстратного аналога по отношению к эластазе. В организме α_1AT выполняет защитную роль. Индивидуумы с врожденным недостатком этого белка предрасположены к эмфиземе, поскольку клетки легких особенно чувствительны к протеолизу. Окислители табачного дыма могут инактивировать α_1AT, что также обусловливает среди курящих повышенную частоту возникновения эмфиземы. Эффективным средством лечения эмфиземы является внутривенное введение α_1-антитрипсина, при этом на одного человека требуется 4 г α_1AT в неделю.

Чтобы получать большие количества α_1AT, была клонирована его кДНК и создан суперпродуцент *E. coli*. Терапевтическое использование α_1AT показало, что он легко окисляется, в результате чего инактивируется. Была предпринята попытка получить вариант α_1AT, устойчивый к химическому окислению. Окислительная инактивация α_1AT обусловлена в первую очередь модификацией Met358, находящегося в участке связывания с эластазой (Pro–Met–Ser). Поэтому олигонуклеотид-направленным мутагенезом в клонированный ген ввели изменения и получили ряд вариантов белка, у которых Met358 был заменен на Val, Ala, Leu, Ile, Phe, Gly или Arg. Новые формы, у которых в положении 358 находились Val, Ala, Leu или Ile, по-прежнему ингибировали эластазу, но при этом были устойчивы к окислительной инактивации. По ингибиторной активности ближе всего к природной форме был вариант α_1AT(Met358 → Leu358). Другие мутанты имели несколько сниженную ингибиторную активность. Белок с заменой Met358 на Phe, Gly или Arg эластазой не узнавался. Однако α_1AT(Met358 → Arg358) стал проявлять свойства ингибитора тромбина (рис. 7.3).

Основной ингибитор тромбина *in vivo* — антитромбин III (ATIII). Его действие эффективно активируется гепарином, поэтому гепарин используют в медицине для предотвращения

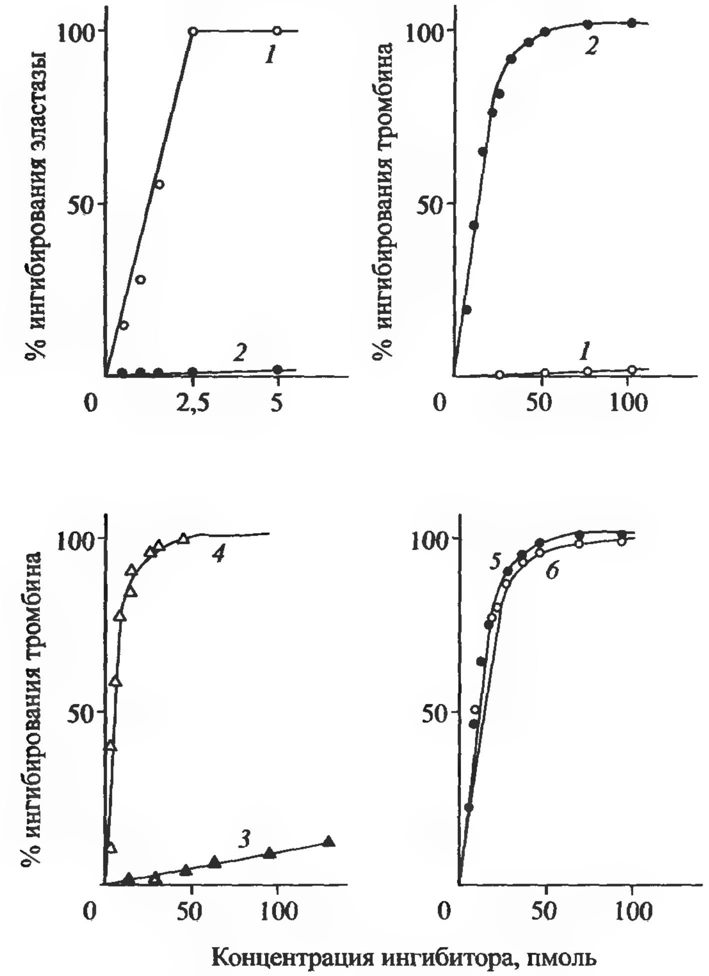


Рис. 7.3. Ингибирование нейтрофильной эластазы и тромбина человека:
1 — α_1AT; *2* — α_1AT(Met358 → Arg358); *3* — антитромбин без добавления, *4* — с добавлением гепарина;
5 — α_1AT(Met358 → Arg358) без добавления, *6* — с добавлением гепарина

тромбоза вен или для разрушения тромбов. Низкие дозы вводят пациентам, у которых существует риск образования тромбов. Однако данный способ лечения дает осложнения, особенно при введении больших доз гепарина, и может вызывать тяжелые геморрагические поражения. В качестве альтернативного антитромбического агента с пониженными побочными эффектами, не зависимого от гепарина, можно использовать генно-инженерный α_1AT(Met358 → Arg358). Таким образом, единственная аминокислотная замена привела к изменению специфичности связывания белка-ингибитора с сериновыми протеазами. α_1AT(Met358 → Arg358) и ATIII имеют гомологию по последовательности аминокислот 29 %, что, по-видимому, указывает на происхождение этих белков от общего предка — ингибитора протеаз. Кроме того, выяснилось, что α_1AT(Met358 → Arg358) эффективно ингибирует такие протеазы плазмы крови, как калликреин и фактор XII. Введение дополнительной мутации (Ala357) повысило эффективность ингибирования калликреина в 5 раз. Считают, что полученный вариант α_1AT также может найти клиническое применение.

Рассмотренные примеры со всей очевидностью демонстрируют удивительные возможности сайтспецифического мутагенеза для создания новых форм белков. Однако методы белковой инженерии не ограничиваются описанными выше процедурами.

7.2. ИЗУЧЕНИЕ ДОМЕННОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ

Многие мультифункциональные белки организованы как серии глобулярных доменов. Одним из первых хорошо изученных белков такого типа является ДНК-полимераза I *E. coli*. Данный фермент состоит из трех доменов, один из которых (N-концевой) легко отщепляется при воз-

действии протеаз, так как соединен с остальной частью белка протеазочувствительным мостиком (см. рис. 1.12). Остающийся большой С-концевой фрагмент (PolIK) бифункционален, но его не удается разделить протеазами на два домена, обладающих разными ферментативными активностями. Для проверки предположения о трехдоменной структуре PolI К. Джойс с сотрудниками провели генно-инженерные манипуляции с геном ДНК-полимеразы. Сначала был клонирован и экспрессирован в *E. coli* полный ген ДНК-полимеразы I *E. coli*, расшифрована его нуклеотидная последовательность. Затем последовательность, кодирующую PolIK, встроили в экспрессирующий вектор и наработали фрагмент Кленова в больших количествах, что позволило кристаллизовать его и осуществить рентгеноструктурный анализ. Выяснилось, что PolIK состоит из двух доменов. Предположили, что С-концевой домен размером 400 АК обладает ДНК-полимеразной активностью. После этого 3′-концевой фрагмент гена ДНК-полимеразы I, кодирующий 414 С-концевых аминокислот, встроили в вектор экспрессии pAS1 (см. рис. 2.43) и наработали в клетках *E. coli* соответствующий белок, продукция которого составила 20–30 % суммарного клеточного белка. Анализ подтвердил, что С-концевой домен PolI обладает только полимеразной активностью. Таким образом, последовательные генно-инженерные манипуляции позволили достоверно определить структурно-функциональную организацию мультиферментного белка ДНК-полимеразы I *E. coli* и получить продуценты его субформ.

Многие мультифункциональные белки, найденные у высших эукариот, содержат ферменты, имеющиеся у прокариот и низших эукариот, у которых, однако, эти ферменты часто кодируются разными генами. Один из изученных мультифункциональных белков высших эукариот — CAD-белок — обладает активностью первых трех ферментов биосинтеза пиримидинов: карбамилфосфатсинтетазы (КФС), аспартаттранскарбамилазы (АТК) и дигидрооротазы (ДГО). Эти же самые ферменты детерминируются тремя отдельными генами в *E. coli* и двумя генами в низших эукариотах, у которых существует бифункциональный белок КФС–АТК. Проклонировав через кДНК фрагмент, кодирующий один из трех ферментов (АТК) CAD-белка, и экспрессировав данную последовательность под контролем промотора p_{lac}, удалось в *E. coli* комплементировать мутацию *pyr*B по гену аспартаттранскарбамилазы, что указывает на функциональное сходство данного фермента у прокариот и эукариот. Полученные данные позволяют предположить, что в процессе эволюции мультифункциональные белки высших эукариот возникали в результате ряда событий, приводящих к слиянию до того независимых генетических единиц.

Доказанная в эксперименте возможность относительно независимого действия отдельных доменов мультифункционального белка привела в 1989 г. к созданию «кассетного» гена активатора тканевого плазминогена (АТП) человека. Данный белок формирует пять доменов с различными функциями. Ген АТП (двухцепочечный фрагмент длиной 1095 пн) был синтезирован химико-ферментативно таким образом, что все последовательности, кодирующие домены, оказались разделены участками гидролиза различными рестриктазами. Небольшие изменения, внесенные при этом в последовательность АТП, не меняли биологических свойств белка. Кассетная структура гена позволяет комбинировать в любом порядке, делетировать домены АТП и изучать свойства создаваемых вариантов, а также обеспечивает возможность экспрессии и изучения функций индивидуальных доменов АТП. Введение уникальных участков рестрикции в области гена, соответствующие фланкирующим домены участкам белка, позволяет заменять домены изучаемого белка на домены другого белка, т. е. конструировать новые белки с заданным набором функций. Рассмотренный подход применим, по-видимому, к большинству мультидоменных белков.

7.3. СОЗДАНИЕ БЕЛКОВ С ГИБРИДНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Большое внимание в генетической инженерии уделяется клонированию и изучению генов интерферона. Это обусловлено тем, что интерфероны составляют семейство белков, которые обладают широким спектром защитных функций, в частности такими, как подавление развития вирусной инфекции, ингибирование онкогенной пролиферации клеток, модулирование иммунного ответа организма. Интерфероны человека классифицируют на три группы — α, β и γ в зависимости от типа клеток, которые их продуцируют, первичной структуры, физико-химических и других свойств.

α-Интерфероны (лейкоцитарные интерфероны) составляют большую группу близкородственных белков. Выявлено 16 отдельных

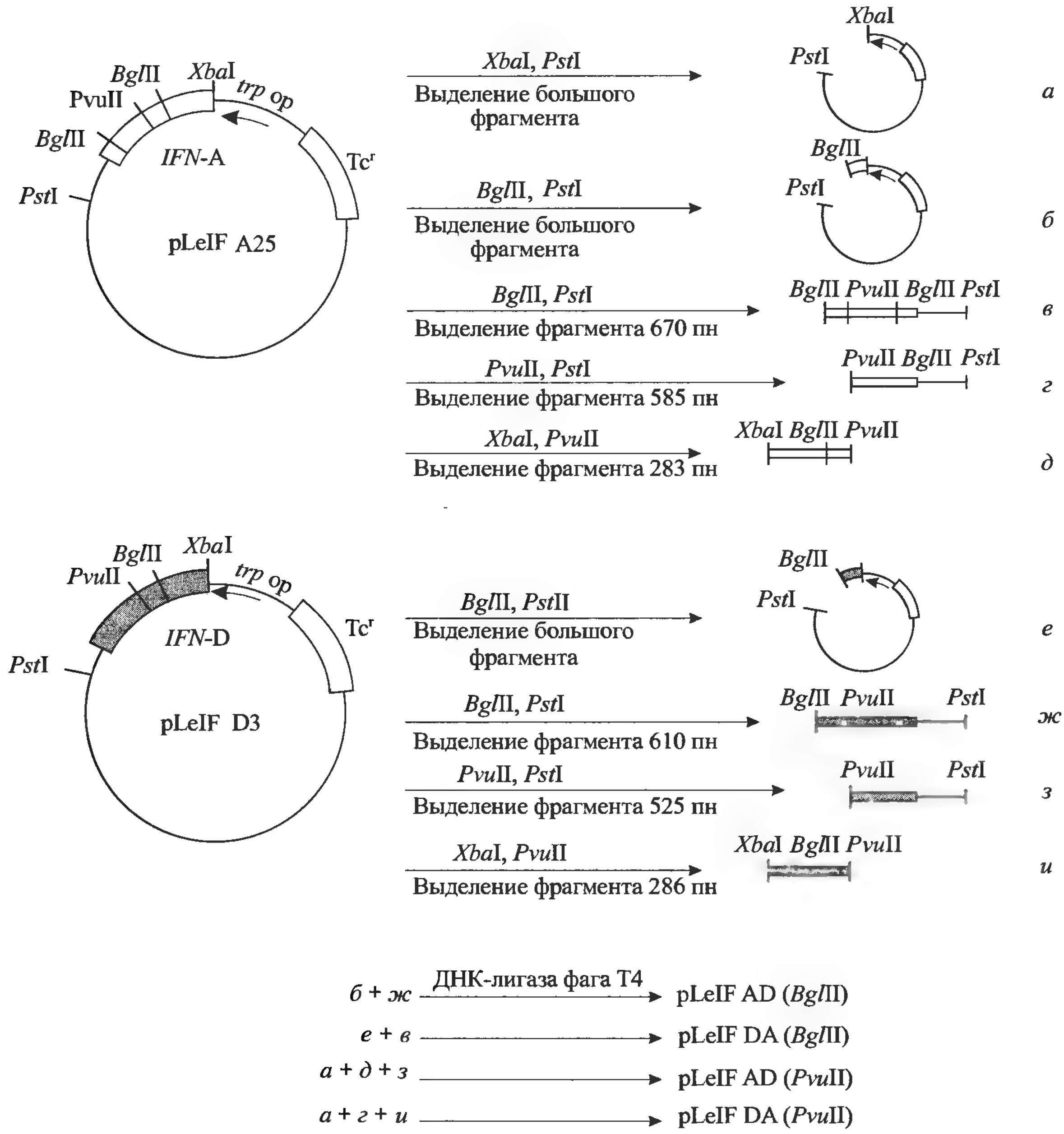


Рис. 7.4. Конструирование плазмид для прямой экспрессии химерных лейкоцитарных интерферонов человека в клетках *E. coli*

генетических локусов для α-интерферонов человека (HuIFN-α). Гены этих белков не раздробленны, т. е. имеют непрерывную кодирующую последовательность. Размер белков составляет 165 или 166 аминокислотных остатков. Последовательности разных подтипов α-интерферона отличаются друг от друга примерно по 20 АК, и общая гомология между всеми изученными последовательностями α-интерферонов человека составляет около 52 %.

Для фибробластного интерферона человека (β-интерферон, HuIFN-β) обнаружен лишь один (нераздробленный) ген. HuIFN-β состоит из 166 АК и по последовательности имеет высокую гомологию с α-интерферонами, которая составляет порядка 35 % относительно усредненной последовательности α-интерферонов.

Иммунный интерферон человека (HuIFN-γ) состоит из 146 АК и не имеет заметной гомологии ни с α-, ни с β-интерферонами. Для него известен один раздробленный, экзон-интронный ген.

Для всех трех типов интерферонов человека в настоящее время методами генетической инженерии созданы многочисленные суперпродуценты, что позволяет получать эти биологически активные белки в большом количестве и практически в индивидуальном состоянии (че-

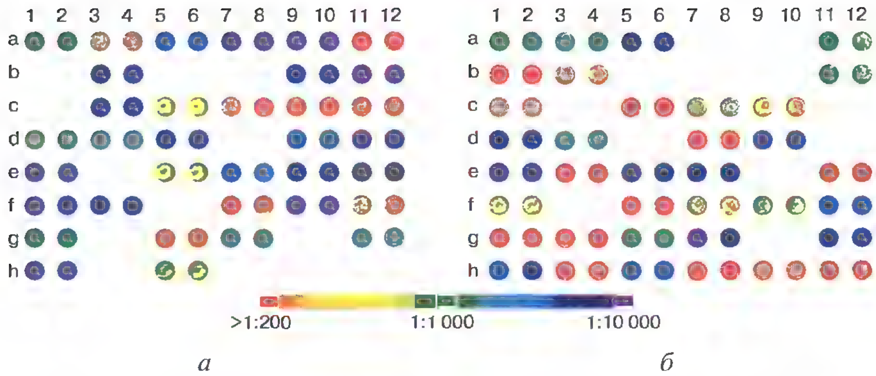


Рис. 1. Экспрессия генов в корнях (*а*) и листьях (*б*) одного и того же растения, анализируемая с помощью гибридизации на матрицах соответствующих кДНК.

Картина сканирования флуоресценции представлена в псевдоцветовой шкале, отражающей интенсивность гибридизации.

Шкала откалибрована по гибридизации со стандартным образцом кДНК

Рис. 2. Гибридизационная микроматрица, отражающая экспрессию ядерных генов синхронизованных фибробластов из эмбриона мыши, индуцируемых белковым фактором E2F на разных этапах клеточного цикла

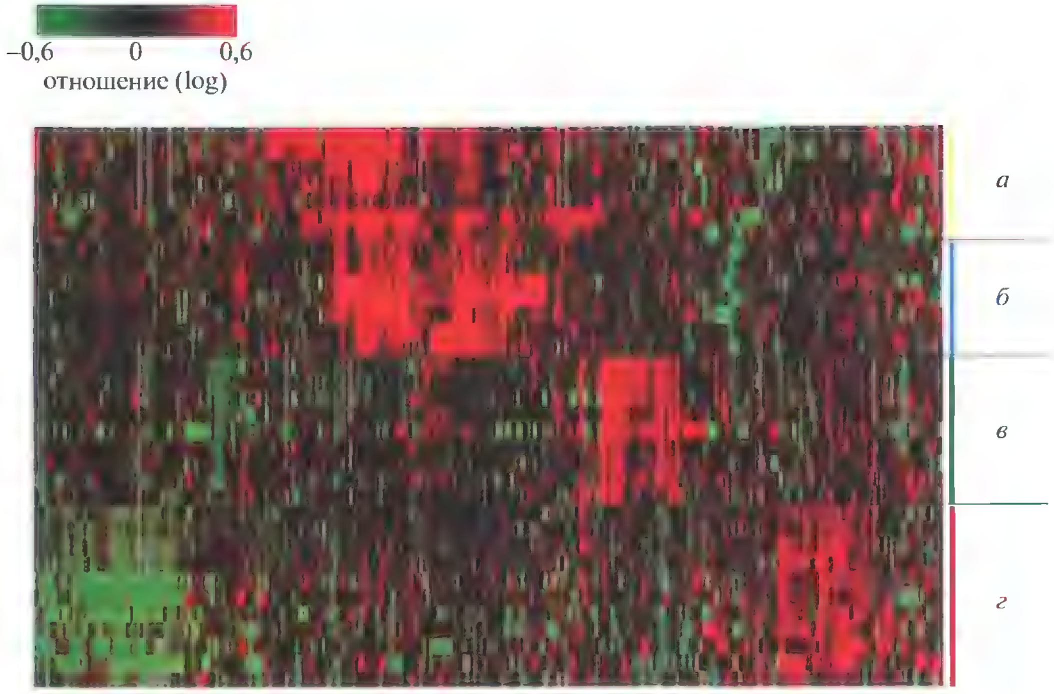
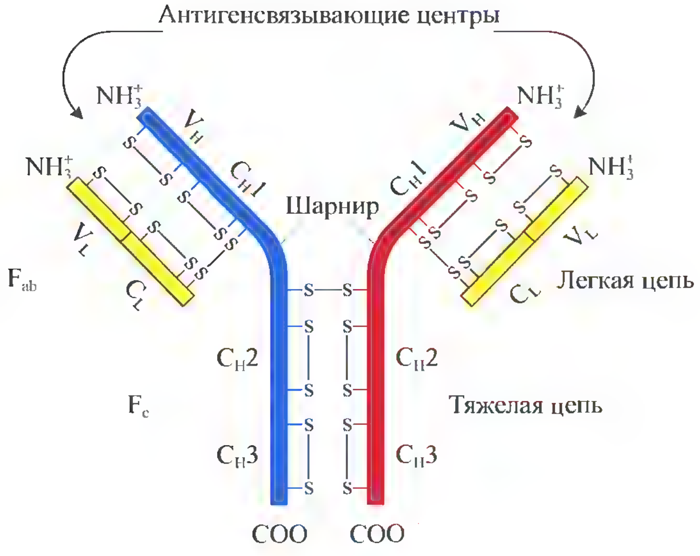


Рис. 3. Гибридизационная микроматрица, отражающая экспрессию 271 гена клеток человека, модулируемую инфекцией вирусами гриппа А (*а*) и иммунодефицита человека (*г*), а также воздействием интерферона (*б*) или теплового шока (*в*)

а



б

Рис. 4. Строение молекулы иммуноглобулина (*а*) и ее схематическое изображение (*б*)

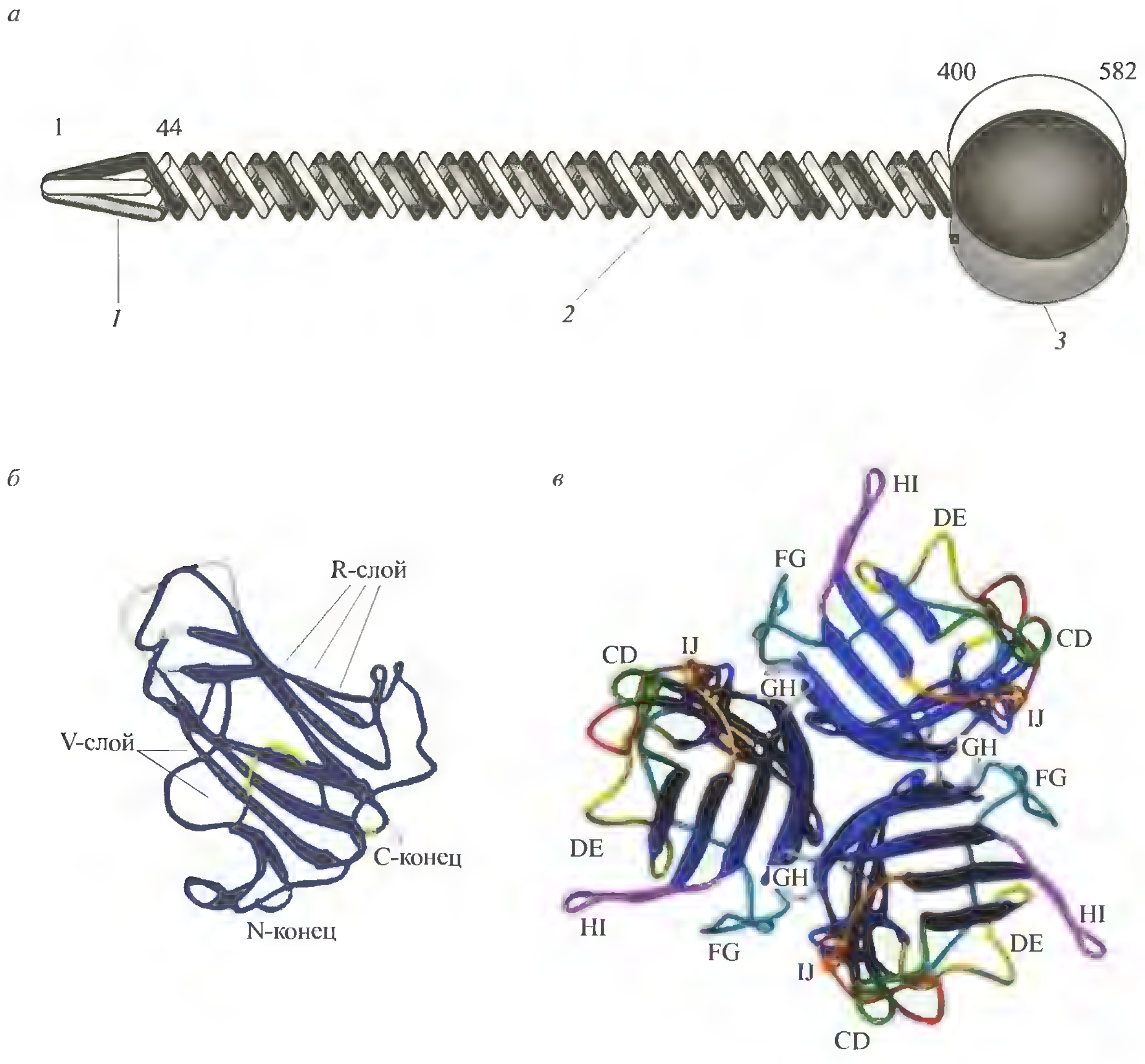


Рис. 5. Строение шипа аденовирусного вириона:
а — доменная структура (*1* — хвостовой, *2* — центральный, *3* — глобулярный домены; вверху — номера аминокислот, ограничивающих домены); *б* — схема мономера глобулярного домена шипа (N-конец соединяется с центральным доменом, С-конец свободный; β-цепи, формирующие слои R и V, показаны синим цветом);
в — схема тримерного глобулярного домена шипа (приведены обозначения петель)

го невозможно добиться при выделении интерферонов из природного источника). Данные препараты и их смеси активно используются в медицине для разработки схем лечения раковых заболеваний, вирусных инфекций и др.

Особый интерес исследователей привлекла группа α-интерферонов, так как индивидуальные подтипы HuIFN-α различаются по уровню противовирусной активности для разных вирусов. Поэтому была проведена серия экспериментов по созданию гибридных генов, кодирующих химерные (гибридные) α-интерфероны, в целях выявления функционально важных районов HuIFN-α. Н. Стэббинг с соавторами (1981–1982 гг.) сконструировали ряд гибридов между генами *IFN*-A (IFN-α2) и *IFN*-D (IFN-α1) (рис. 7.4). Гибридные гены экспрессировали в *E. coli*, синтезированные химерные белки выделяли и изучали их антивирусные свойства. Оказалось, что гибриды IFN-α AD имеют существенно бóльшую антивирусную активность по сравнению с родительскими интерферонами, а варианты IFN-α DA — сниженную.

Е. Цвартхофф с соавторами (1987 г.) применили подход, позволяющий получать разнообразные гибридные гены лейкоцитарного интерферона, которые образуются в результате рекомбинации клонированных генов *in vivo*. Были использованы гены мышиных интерферонов α1 и α4. Эти белки различаются между собой по последовательности лишь на 20 %, тогда как по противовирусной активности различия существенные. Оба изучаемых гена встраивали в одну векторную плазмиду, переводили ее в линейную форму и трансформировали клетки *E. coli recA*$^+$ (рис. 7.5). После рекомбинации *in vivo* отбирали плазмиды, несущие гибридные гены $\alpha1\alpha4$. Такие варианты генов обозначили α14-1, α14-2 и т. д. Области кроссинговера в гибридах устанавливали с помощью рестрикционного анализа. Структура некоторых из этих гибридных генов приведена на рис. 7.6. Оказалось, что ряд гибридных интерферонов проявляет значительно бóльшую по сравнению с исходными формами противовирусную активность (рис. 7.7).

Таким образом, создавая гибриды между близкородственными α-интерферонами, можно получить варианты, превосходящие по своим биологическим свойствам родительские формы. Данное направление исследований, несомненно, перспективно для медицинской и ветеринарной практики. Кроме того, конструирование гибридов близкородственных белков позволяет глубже понять закономерности структурно-функциональной организации изучаемого класса белков.

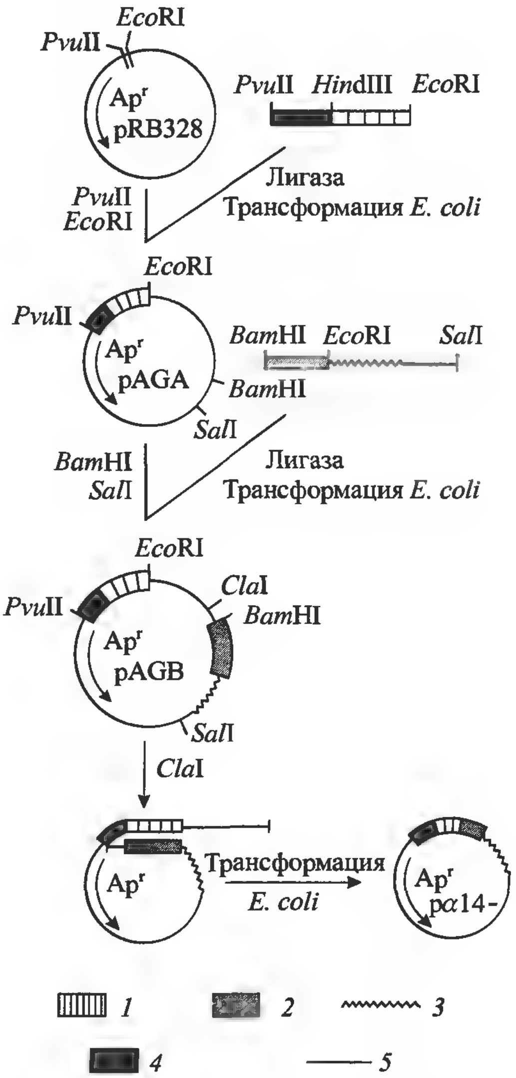


Рис. 7.5. Создание гибридных генов мышиного интерферона IFN-$\alpha1\alpha4$ рекомбинацией *in vivo*:

1 — последовательность гена IFN-α1, *2* — IFN-α4, *3* — β-глобина кролика; *4* — последовательность ДНК вируса SV40, *5* — плазмиды pBR328

Новые типы лечебных препаратов можно получить, если создать белок, обладающий биологическими активностями, свойственными двум или более неродственным белкам. На принципиальную возможность конструирования таких молекул указывает наличие мультифункциональных природных белков, которые могут различаться по своей организации у прокариот и эукариот. Первую успешную работу в данном направлении выполнили М. Сено с соавторами (1986 г.). Они создали гибридный ген, который кодировал химерный белок, состоящий на N-конце из 135 АК HuIFN-γ (делеция 11 АК с С-конца) и из 134 АК интерлейкина 2 человека (IL-2) на С-конце (полная последовательность). Иммунный интерферон соединили с ин-

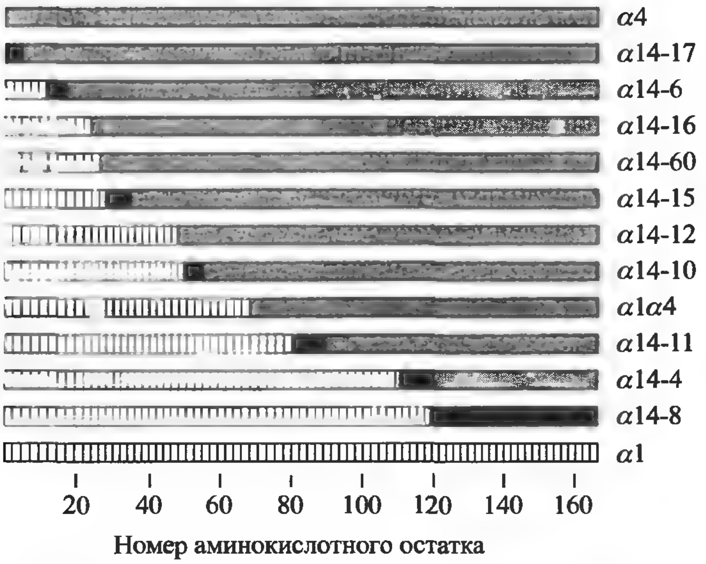


Рис. 7.6. Структура гибридных генов мышиных лейкоцитарных интерферонов, полученных в результате рекомбинации генов в клетках *E. coli*.

Черными блоками обозначены области кроссинговера

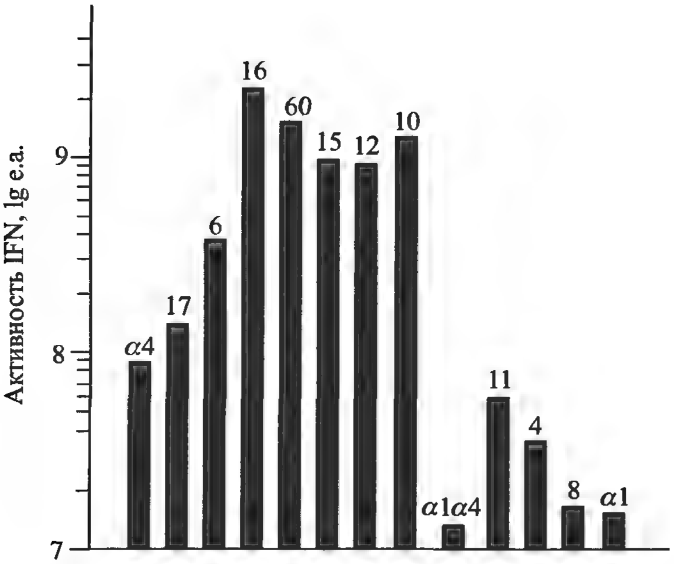


Рис. 7.7. Специфическая антивирусная активность лейкоцитарных интерферонов мыши α1, α4 и их гибридов (см. рис. 7.6) на культуре клеток L929.

Противовирусная активность определялась по подавлению цитопатического эффекта, вызываемого вирусом везикулярного стоматита

Таблица 7.1. **Биологическая активность белков, продуцируемых в клетках *E. coli* клонированными генами**

Гибридная плазмида	Белок	Активность (е.а./л культуры)	
		IFN-γ	IL-2
pIFL9906	IFN-γ/IL-2	$1{,}2 \cdot 10^6$	$1{,}1 \cdot 10^4$
pHITtrp1101	IFN-γ	$300{,}0 \cdot 10^6$	0
pTF1	IL-2	0	$12{,}0 \cdot 10^4$

терлейкином через сегмент из четырех аминокислотных остатков. В клетках *E. coli* сконструированный гибридный ген эффективно экспрессировался под контролем промотора p_{trp}. Химерный белок выделяли и изучали его свойства. Оказалось, что химера IFN-γ/IL-2 обладает активностями обоих родительских белков (табл. 7.1). При этом соотношение активностей интерферона и интерлейкина в молекуле у химеры составило 109, т. е. мало отличалось от этого же соотношения для природных белков — 113

(удельная активность IFN-γ — 4,5 · 10^6 е.а./мг, а IL-2 — 4 · 10^4 е.а./мг). Полученные результаты демонстрируют, что в составе химеры оба белка практически полностью сохраняли свою биологическую активность. Это указывает на большую перспективность создания нового типа лечебных препаратов на основе химерных белков.

7.4. ИММУНОТОКСИНЫ

В начале XX в. П. Эрлих высказал предположение о возможности использовать антитела в качестве носителей фармакологических агентов. Однако реализовываться данный подход начал лишь в 1970-е гг. За прошедшее время достигнут значительный прогресс в избирательном уничтожении клеток *in vitro* и *in vivo* при взаимодействии их с антителами, соединенными с токсическими агентами. Такие белковые гибриды, получаемые в результате химического связывания (конъюгации) *in vitro* специфических антител (иммуноглобулинов) с полипептидными токсинами, называют иммунотоксинами.

Наиболее хорошо изучен дифтерийный токсин (ДТ), синтезируемый патогенной бактерией *Corynebacterium diphtheriae*. Первоначально токсин производится в неактивной форме (протоксин), затем после специфичного эндопротеазного расщепления белок распадается на две функционально и иммунохимически различные субъединицы — А (21 кДа) и Б (39 кДа). При этом происходят значительные изменения во вторичной структуре полипептидов, обеспечивающие появление специфичных свойств токсина (часто этот процесс называют активацией токсина). Токсический эффект обусловлен действием N-концевой субъединицы А, которая обладает NAD-гликогидролазной и ADP-рибозилтрансферазной активностями. В результате катализируемых этим ферментом реакций происходит специфическая инактивация эукариотического фактора элонгации EF-2, после чего тот теряет способность связываться с рибосомами 80S и, следовательно, участвовать в биосинтезе белка. В основе молекулярного механизма инактивации EF-2 лежат две ферментативные реакции, которые катализируются субъединицей А дифтерийного токсина после проникновения его в цитоплазму эукариотической клетки:

$$1.\ NAD^+ + H_2O \overset{ДТ}{\rightleftharpoons} \text{ADP-рибоза} + \text{Никотинамид} + H^+$$

$$2.\ \text{ADP-рибоза} + \text{EF-2} \overset{ДТ}{\rightleftharpoons} \text{ADP-рибоза–EF-2}$$

На первом этапе токсин гидролизует NAD до ADP-рибозы и никотинамида, на втором — переносит ADP-рибозу на EF-2. При этом комплекс EF-2–ADP-рибоза полностью неактивен. Субъединица А не способна катализировать ADP-рибозилирование фактора элонгации G митохондрий и EF-G бактерий. Поэтому дифтерийный токсин не нарушает процесс синтеза белка на 70S-рибосомах.

Скорость и эффективность реакций, катализируемых субъединицей А, очень высока. Известно, что достаточно одной молекулы субъединицы А, чтобы убить клетку-мишень. Важно отметить, что в отсутствие субъединицы Б субъединица А не может проникнуть в клетку и поэтому не проявляет токсического эффекта.

Действие дифтерийного токсина проявляется в результате последовательных процессов, таких как адсорбция на специфических клеточных рецепторах (обеспечивается субъединицей Б), транспорт через плазматическую мембрану в цитоплазму клетки и инактивация внутриклеточной мишени — EF-2 (субъединица А).

Изучение различных бактериальных токсинов показало, что фрагментирование полипептидной цепи протоксина с образованием активной субъединицы А и акцепторной субъединицы Б — широко распространенный механизм. Явление протеолитической активации известно также и для растительных токсинов, таких как рицин, рабин и модексин.

После того как была установлена структурно-функциональная организация ряда токсинов бактериального и растительного происхождения, стали предприниматься попытки создания иммунотоксинов. Особенно активно для этих целей использовали рицин и, в меньшей степени, дифтерийный токсин. Оказалось, что замена Б-субъединицы различными молекулами (гормонами, факторами роста, антителами) приводит к формированию гибридных молекул, у которых специфичность связывания с клетками изменена, но токсический эффект А-субъединицы сохранен. Такие белки не столь токсичны для организма в целом, как природный токсин, но высокотоксичны для клеток-мишеней. Важно отметить, что на клетках, у которых нет соответствующих рецепторов, токсического эффекта они не проявляют.

Создание иммунотоксинов — это новый современный подход в фармакологии. Препараты данного типа могут быть очень эффективны при терапии опухолей, модуляции иммунного ответа и др. Однако первоначально разработанный метод довольно трудоемкий и, кроме того, не обеспечивает стандартности иммунотоксина: необходимо выделять А-субъединицу токсина, целевой белок, обеспечивающий связывание с определенными рецепторами, затем осуществлять конъюгацию этих компонентов через дисульфидную связь.

Преодолеть данное затруднение удалось Дж. Марфи с соавторами (1983–1988 гг.), выполнившим серию генно-инженерных работ по созданию химерных токсинов. Прежде всего был клонирован фрагмент ДНК, содержащий промотор и последовательность, кодирующую сигнальный пептид и А-субъединицу дифтерийного токсина. Получен штамм *E. coli*, продуцирующий гибридный белок и секретирующий его в периплазматическое пространство клеток. Затем был сконструирован гибридный ген дифтерийного токсина, у которого 3′-концевой участок, кодирующий рецепторсвязывающий домен Б, заменен на синтетический ген-эквивалент меланоцитстимулирующего гормона α человека (αMSH, состоит из 13 АК). Химерный белок tox–αMSH также секретировался в периплазму *E. coli*. Он оказался селективно токсичным для культуры клеток злокачественной меланомы человека (NEL-M1), имеющих на поверхности рецепторы для αMSH, и не действовал на культуры клеток китайского хомячка (CHO) и африканской зеленой мартышки, не имеющих αMSH-рецепторов. После этого был создан штамм *E. coli*, продуцирующий химерный белок tox–IL2, у которого рецепторсвязывающий домен дифтерийного токсина замещен соответствующим доменом фактора роста человеческих Т-лимфоцитов — интерлейкина 2 (IL-2). Полученный токсин проявлял токсический эффект по отношению к Т-клеткам человека и мыши. Более того, при введении мышам он обладал иммуносупрессивными свойствами, т. е. являлся иммунотоксином направленного действия.

Таким образом, методы генетической инженерии позволяют создавать химерные иммунотоксины, которые можно в больших количествах нарабатывать в бактериальных клетках, получать стандартные высокоочищенные препараты и использовать их для клинических целей. Очевидно, что данное направление исследований имеет большое будущее.

7.5. ФАГОВЫЙ ДИСПЛЕЙ

7.5.1. Принцип метода

Простота организации вириона и очень высокая концентрация вируса, достигаемая при культивировании в клетках *E. coli* (более 10^{12} частиц в 1 мл), позволили реализовать для нитевидных фагов подход, получивший название «фаговый дисплей». Его суть заключается в том, что в составе химерных оболочечных белков нитевидных фагов экспрессируются целевые аминокислотные последовательности, которые после сборки фаговых частиц находятся (представляются) на их поверхности. При этом гены со встройками, кодирующими целевые пептиды, находятся внутри таких вирионов в составе упакованного фагового генома, т. е. химерный белок и кодирующий его ген физически сцеплены (рис. 7.8). Гибридные вирионы могут быть селектированы путем аффинного связывания представленных на их поверхности чужеродных аминокислотных последовательностей с какими-либо макромолекулами. Таким образом интересующий исследователя вариант фага можно выделить и размножить для дальнейшего изучения.

Основные принципы фагового дисплея были заложены уже в первой работе Г. Смита, опубликованной в 1985 г. В состав гена *III* фага f1 по уникальному участку гидролиза рестриктазой *Bam*HI были встроены *Sau*3AI-фрагменты гена рестриктазы *Eco*RI. Один из отобранных после трансфекции клеток *E. coli* гибридный вариант фага, обозначенный fECO1 и названный ***слитым фагом*** (fusion phage), содержал вставку размером 171 пн, которая располагалась между последовательностями, кодирующими C- и N-концевые домены pIII, и не нарушала рамку трасляции данного фагового белка.

Белок pIII нитевидных фагов требуется не только для адсорбции фаговых частиц на F-пилях клеток *E. coli,* но также для завершения процесса сборки вирионов и стабилизации их структуры. Задержка в присоединении pIII приводит к образованию необычно длинных частиц так называемого ***полифага***, содержащего два и более фаговых генома. Даже фаги дикого

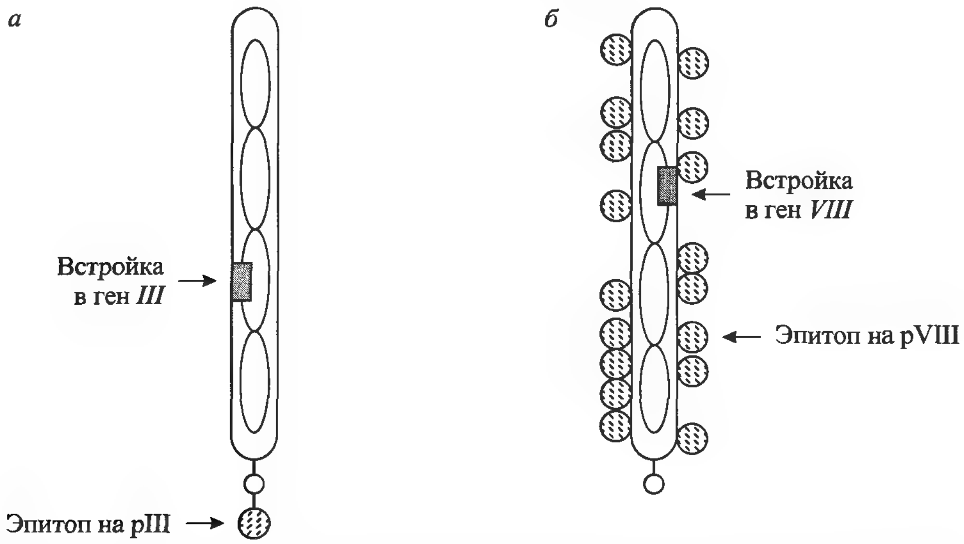


Рис. 7.8. Нитевидные фаги, представляющие на поверхности частиц пептидные эпитопы, слитые с белком оболочки pIII (*а*) или pVIII (*б*)

типа обычно продуцируют около 5 % потомства в виде полифагов. N-концевой домен, включающий 2/3 молекулы pIII, обусловливает адсорбцию фаговых частиц на клетках *E. coli*, в то время как C-концевая часть данного белка контролирует сборку вирионов и стабильность их структуры. Мутанты фага, продуцирующие белок pIII, утративший бóльшую часть N-концевого домена, образуют нормальное число неинфекционных частиц монофагов, но мутанты по C-концевому домену pIII либо летальны для бактерии, либо продуцируют неинфекционные и относительно нестабильные полифаги.

Фаг fECO1 формировал очень мелкие бляшки на газоне клеток *E. coli*, его инфекционность по сравнению с исходным фагом была снижена в 25 раз и в потомстве было значительно выше содержание мультимерных полифагов. Тем не менее антигенные детерминанты, кодируемые вставкой 171 пн из состава гена *Eco*RI, были представлены на поверхности вириона, поскольку гибридный фаг fECO1 эффективно нейтрализовался антителами против рестриктазы *Eco*RI, в то время как на фаг f1 эти антитела не оказывали никакого влияния.

Затем антитела против *Eco*RI адсорбировали на поверхности полистиреновой чашки Петри и наносили на нее смесь, содержащую fECO1 (10^6 БОЕ/мл) и большой избыток M13mp8 ($6 \cdot 10^{10}$ БОЕ/мл). Несвязавшиеся фаги смывали с чашек свежей средой, а затем элюировали адсорбировавшиеся фаговые частицы кислым буфером, нейтрализовали его щелочью и титровали полученный препарат на разных штаммах *E. coli*. Оказалось, что препарат гибридного фага за один цикл может быть обогащен частицами, связывающимися со специфичными к встройке антителами, в 1500–7200 раз. Исходя из полученных результатов автор сделал заключение, что антитела могут быть использованы для отбора специфичных клонов из библиотеки слитых фагов, содержащих разнообразные случайные вставки кодирующих последовательностей.

В следующей работе С. Пармлей и Г. Смит (1988 г.) значительно улучшили процедуру аффинной селекции слитых фагов на специфичных антителах, воспользовавшись тем, что биотинилированные антитела с высокой эффективностью связываются со стрептавидином. В работе использовали биотинилированные антитела против β-галактозидазы и гибридные фаги fd-tet, у которых в состав гена *III* были встроены в правильной рамке трансляции фрагменты гена *lacZ* размером 71 пн (положения 1338–1408 кодирующей последовательности *lacZ*) или 335 пн (положения 861–1195). На поверхности полистиреновых чашек Петри адсорбировали стрептавидин и наносили на них смесь слитых фагов и фагов дикого типа f1, предварительно инкубированных с биотинилированными антителами против β-Gal (рис. 7.9). После адсорбции и отмывки связавшиеся фаговые частицы элюировали кислым буфером, который затем нейтрализовали щелочью. Оказалось, что даже при избытке фага дикого типа в 10^8 раз удается успешно обогащать слитый фаг в $6 \cdot 10^4 - 1 \cdot 10^5$ раз за один цикл адсорбции. Полученным препаратом, содержащим как обогащенный слитый фаг, так и неспецифично связавшийся с антителами фаг дикого типа, инфицировали клетки *E. coli* и распределяли их по агаризованной питательной

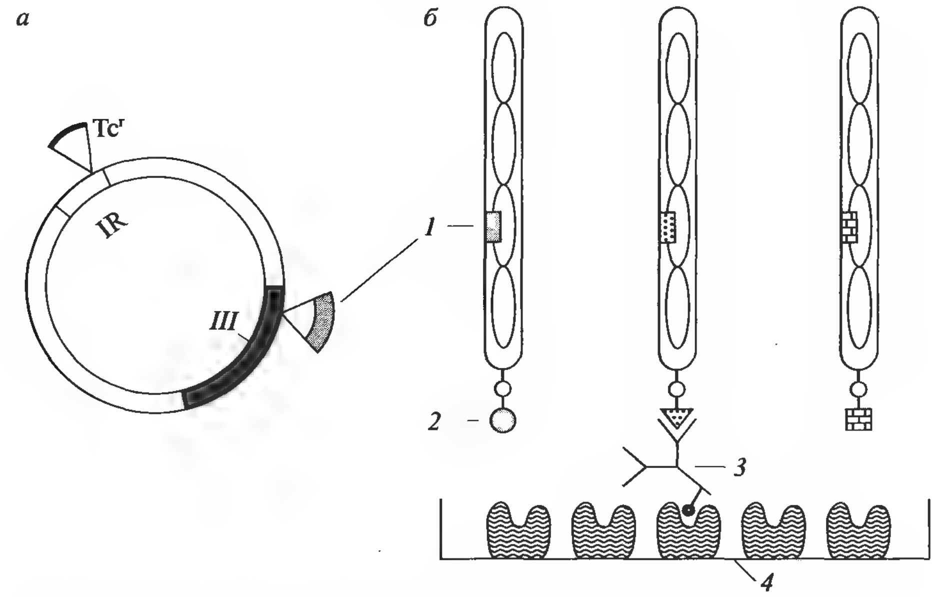


Рис. 7.9. Схема генома слитого нитевидного фага (*а*) и принцип биопенинга (*б*):
1 — олигонуклеотидная встройка, кодирующая эпитоп; *2* — эпитоп; *3* — биотинилированное антитело; *4* — чашка Петри с адсорбированным стрептавидином

среде с тетрациклином для размножения фага, который подвергали второму циклу аффинной адсорбции с антителами. При этом достигалось обогащение слитого фага уже в 10^6 раз. Разработанная процедура была названа ***биопенингом*** (от англ. panning — промывка золотоносного песка). В дальнейшем кроме белка pIII в качестве носителей для биопенинга испытывали белки pVIII и pVI. Однако наилучшие результаты получены для pIII, и поэтому в большинстве работ используют встройки в ген *III* нитевидных фагов.

7.5.2. Пептидные фаговые библиотеки

Г. Смит и С. Пармлей, основываясь на результатах модельных экспериментов, сформулировали концепцию фаговой эпитопной (пептидной) библиотеки, которая представляет собой смесь нитевидных фагов, экспрессирующих в составе своего поверхностного белка в иммунохимически доступном виде любые возможные аминокислотные последовательности определенного размера. Например, пептид длиной 6 АК имеет 64 млн различных вариантов.

Биопенинг такой эпитопной библиотеки с определенным моноклональным антителом позволяет отбирать слитые фаги, специфично взаимодействующие с этим антителом. Секвенирование встроек в геноме отобранных клонов фага дает информацию о структуре эпитопа (эпитопов), узнаваемого изучаемым антителом. Полученная информация может быть использована для картирования эпитопов на определенном белке, при разработке тест-систем для идентификации инфекционных агентов, дизайне генно-инженерных вакцин.

Идею эпитопной библиотеки реализовали Дж. Скотт и Г. Смит в 1990 г. Они создали библиотеку фагов, у которых в ген *III* вслед за последовательностью, кодирующей сигнальный пептид pIII, в той же рамке трансляции были встроены сегменты ДНК, соответствующие всем возможным вариантам гексапептидов. Таким образом, индивидуальный фаг содержал в геноме одну из примерно 10^9 различных встроенных нуклеотидных последовательностей и представлял на вирионе соответствующий гексапептидный эпитоп в составе своих пяти молекул pIII. На N-конце зрелого белка pIII встроенный гексапептид был ограничен четырьмя аминокислотными остатками.

В качестве модельной системы для тестирования эпитопной библиотеки авторы выбрали два моноклональных антитела (monoclonal antibody, MAb) — A2 и M33, специфичных для гексапептидного эпитопа (DFLEKI) белка миогемеритрина. После второго и третьего циклов биопенинга выделяли ДНК индивидуальных клонов слитых фагов и секвенировали встройки в гене III. Результаты этих экспериментов, представленные в табл. 7.2, демонстрируют разнообразие эпитопов, с различной эффективностью взаимодействующих с выбранными моноклональными антителами.

Таблица 7.2. **Результаты анализа клонов слитых фагов, отобранных по аффинному связыванию с моноклональными антителами (MAb)**

	Число клонов, изолированных на MAb		Связывание (ОП · 10^3)*			
			MAb M33		MAb A2	
Последовательность	M33	A2	Fab	IgG	Fab	IgG
DFLEKI			72	352	136	235
Третий цикл биопенинга						
----WL	16		203	551	229	233
----ML	1	2	92	558	269	236
---AWL		14	14	242	139	273
Второй цикл биопенинга						
----R-	1		94	318	118	290
CRFVWC	2		65	331	–4	–5
CE---C	1		18	294	–1	123
CR---C	1		21	205	4	217
--M-WL	1		35	288	1	125
---VQL	1		5	127	23	147
---AIV		4	15	43	97	142
----Y-		2	67	157	9	253
----IL		1	100	431	159	308
----IV		1	37	168	195	293

Примечания: 1. Прочерками обозначены аминокислотные остатки, идентичные соответствующим остаткам в последовательности миогемеритрина, представленной в верхней строке.

2. Связывание определяли по оптической плотности (ОП), полученной в иммуноферментном анализе.

Эпитопные библиотеки на основе нитевидных фагов обеспечивают гораздо более эффективную и дешевую альтернативу химическому синтезу пептидов с целью картирования непрерывных эпитопов, связывающихся с MAb. С помощью фаговых библиотек можно картировать и прерывистые конформационные эпитопы (см. гл. 17), однако это обычно возможно только в том случае, когда известна трехмерная структура белка.

Эпитопная библиотека позволяет идентифицировать лиганды для антител в сложной поликлональной сыворотке. Поэтому аффинный отбор слитых фагов при использовании сывороток крови пациентов, инфицированных вирусами, бактериями или паразитами, дает возможность идентифицировать пептиды, пригодные для использования в тест-системах для диагностики соответствующих патогенов.

Используя в процедуре биопенинга растворимые формы рецепторов или другие связывающие белки, можно обнаружить пептиды, которые мимикрируют под активные детерминанты на гормонах, цитокинах, субстратах ферментов, вирусах и др.

Фаговый дисплей благодаря своей методической простоте получил широкое распространение. В ряде лабораторий независимо созданы случайные пептидные фаговые библиотеки для пептидов размером от 6 до 38 АК. Следует иметь в виду, что уже для октапептидов сложно создать полную библиотеку возможных вариантов.

7.5.3. Фаговый дисплей белков

Встройка протяженных аминокислотных последовательностей в состав оболочечных белков нитевидных фагов может приводить к утрате жизнеспособности фагов из-за нарушения процессов сборки вирионов и/или адсорбции фаговых частиц на бактериальных клетках. Преодолеть данное затруднение часто удается за счет использования клонирующей системы фагмид (см. 2.2.7). В составе фагмид экспрессируют варианты слитого гена *III* или *VIII*. Инфекция клеток *E. coli*, несущих такие гибридные фагмиды, фагом-помощником (нитевидный фаг, дефектный по упаковке в вирион собственной ДНК) обычно приводит к формированию фаговых частиц, содержащих фагмидную одноцепочечную ДНК и составленных как

из белков дикого типа, так и из слитых вариантов. Таким образом возникают вирионы, мозаичные по белку-носителю. Для фагмидных векторных систем приняты следующие обозначения: тип 3 + 3 — при встройке в ген *III*, тип 8 + 8 — при встройке в ген *VIII*.

Другой вариант клонирования — тип 33 (или тип 88) — заключается в том, что в одном фаговом геноме имеются одновременно ген *III* дикого типа и гибридный вариант этого гена. Последний обычно клонируют в IR-области. Классический вариант фагового дисплея (см. 7.5.2) обозначают как тип 3 (или 8).

7.5.4. Направленная эволюция белков

На основе фагового дисплея разработан методический подход, названный направленной эволюцией белков. Последовательности ДНК выделенных в результате биопенинга пептидов или белков, аффинно связывающихся с целевой макромолекулой, подвергают мутагенезу и формируют вторичную фаговую библиотеку, которая содержит разные варианты отобранной на первом этапе последовательности. При анализе созданной вторичной библиотеки слитых фагов можно обнаружить вариант, который связывается с целевой макромолекулой с гораздо большей эффективностью.

Другой способ предполагает использование известной нуклеотидной последовательности, кодирующей природный пептид или фрагмент белка, который связывается с целевой макромолекулой, и создание библиотеки слитых фагов, несущих и идеале все возможные варианты этой последовательности.

В первой работе по направленной эволюции белков Б. Робертс с соавторами (1992 г.) осуществили кассетный мутагенез пентапептида в ингибиторе панкреатического трипсина быка (ИПТБ) и создали библиотеку фага M13, в которой в составе слитого белка pIII было представлено около 1000 вариантов данного ингибитора. В результате биопенинга был выявлен вариант ИПТБ, который по эффективности связывания с нейтрофильной эластазой человека превосходил исходный белок в $3{,}6 \cdot 10^6$ раз. В дальнейшем работы, выполненные в других лабораториях, подтвердили продуктивность данного подхода для белков разного типа.

7.5.5. Фаговый дисплей антител

Большую роль в современной медицине и ветеринарии играет иммунопрофилактика инфекционных заболеваний. При развитии инфекционного заболевания в иммунной системе организма индуцируются процессы, направленные на инактивацию патогенного микроорганизма. Важное значение в такой инактивации играют антитела (иммуноглобулины, Ig). Структурная единица иммуноглобулина состоит из двух одинаковых легких и двух одинаковых тяжелых полипептидных цепей, соединенных вместе дисульфидными связями (рис. 4, *б*, цв. вклейка). У большинства млекопитающих обнаружено пять классов иммуноглобулинов: IgG, IgA, IgM, IgD и IgE. IgG — главный изотип иммуноглобулинов нормальной сыворотки крови человека.

Цепи иммуноглобулинов свернуты в несколько глобулярных структур, называемых доменами (см. рис. 4, *а*, цв. вклейка). N-концевые домены легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина являются вариабельными и обозначаются соответственно V_L и V_H. C-концевой домен легкой цепи является константной частью и обозначается C_L. Тяжелые цепи содержат по три константных домена: C_H1, C_H2 и C_H3.

Каждый иммуноглобулин выполняет две функции. Одна область его молекулы предназначена для связывания с антигеном, а другая осуществляет так называемые эффекторные функции. К ним относится связывание иммуноглобулина с тканями организма, различными клетками иммунной системы и белками системы комплемента. Антигенсвязывающие центры образованы вариабельными участками цепей Ig. Протеолитический фермент папаин расщепляет молекулу IgG на три фрагмента: два антигенсвязывающих Fab и один Fc.

Оказалось, что с помощью технологии фагового дисплея можно на поверхности вирионов нитевидных фагов представлять Fab-фрагменты иммуноглобулинов. Для этих целей обычно используют систему клонирования типа 3 + 3 (см. 7.5.3). В фагмиде конструируют ген, в котором последовательность, кодирующую легкую или тяжелую цепь Fab-фрагмента IgG, объединяют в правильной рамке трансляции с геном *III*. Вторая, дополняющая полипептидная цепь Fab-фрагмента экспрессируется в свободном виде. При этом обе целевые кодирующие последовательности состыковывают с ген-эквивалентом сигнальных пептидов (рис. 7.10, *а*). После секреции в периплазматическое пространство клетки *E. coli* обе цепи ассоциируют и образуют активный Fab-фрагмент (см. рис. 7.10, *б*).

Для поиска методом фагового дисплея специфичных антител, взаимодействующих с целевыми антигенами, создают ***библиотеки ан-***

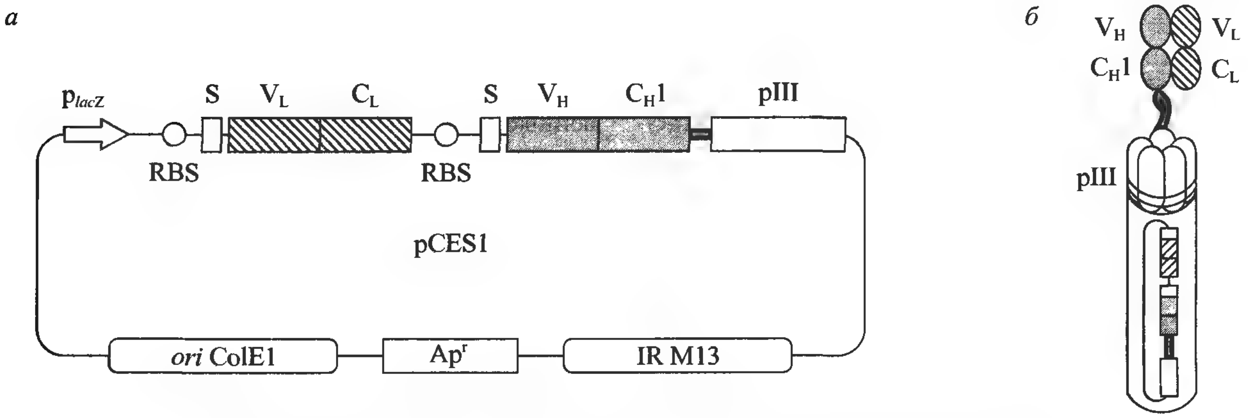


Рис. 7.10. Гибридная фагмида, экспрессирующая слитый белок V_HC_H–pIII и автономный полипептид V_LC_L (*а*), и частица слитого фага (*б*)

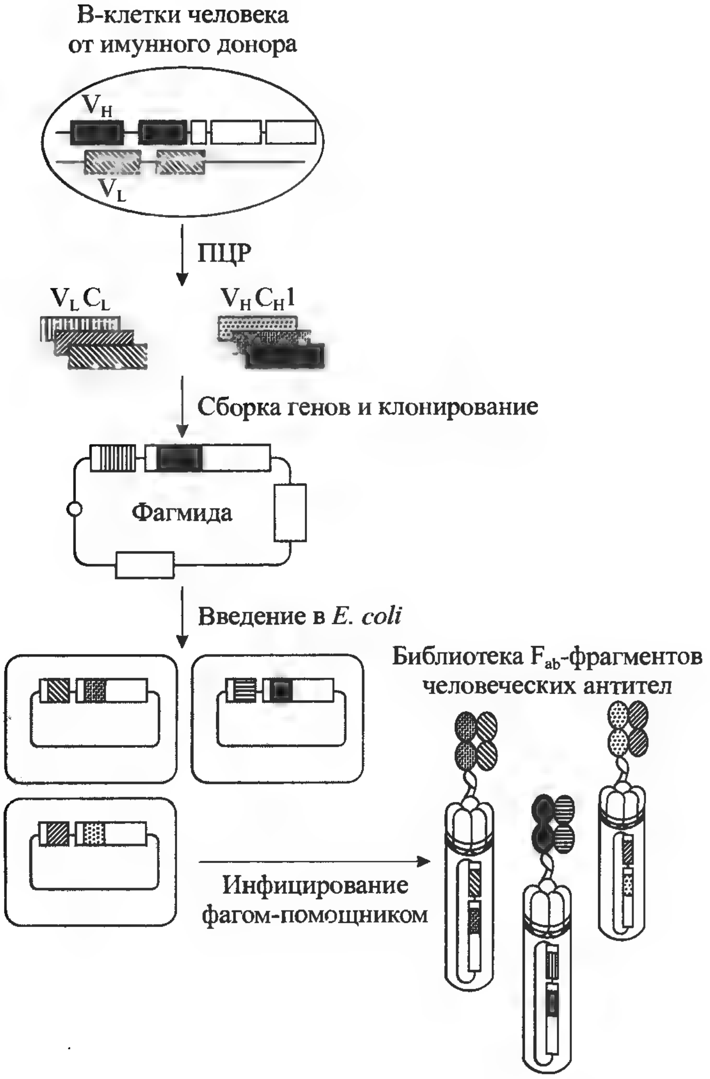


Рис. 7.11. Схема создания фаговой библиотеки антител (Fab-фрагментов).

Фрагменты генов тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов амплифицируют в ПЦР из ДНК В-клеток человека и собирают в кодирующие последовательности, которые в правильной рамке трансляции встраивают в ген *III* в составе фагмиды (см. рис. 7.10)

тител (Fab-фрагментов), представленных на поверхности фаговых частиц. При этом наилучшие результаты могут быть достигнуты, если использовать в качестве источника генов IgG В-лимфоциты специфически иммунизированных доноров. Использование библиотек антител от неиммунизированных доноров обычно не позволяет выделить антитела, высокоэффективно связывающие изучаемый антиген(ы) (например вирус). Схема создания фаговых библиотек антител приведена на рис. 7.11. Представительные библиотеки Fab-фрагментов обычно содержат 10^9–10^{10} клонов слитых фагов.

Хотя селектированные в результате биопеннинга антитела представляют несомненный интерес для научных исследований, их аффинность часто недостаточна для использования в иммунотерапии, нейтрализации вирусов или высокочувствительной иммунодиагностике. Для создания антител с более высоким сродством к целевому антигену на основе отобранных на первом этапе слитых фагов формируют ***вторичные фаговые библиотеки антител***. *V*-гены в каждом отобранном клоне слитого фага подвергают мутагенезу, получая их множественные варианты. Вторичные библиотеки подвергают анализу на наличие вариантов с повышенной аффинностью к изучаемому антигену. Фактически в данном случае реализуется подход направленной эволюции белков.

Отобранные методом фагового дисплея гены Fab-фрагментов с высокой аффинностью к целевому антигену могут быть затем использованы для реконструкции кодирующей последовательности молекулы полного иммуноглобулина человека. Экспрессируя такой ген в эукариотической системе, можно получать высокоэффективные моноклональные человеческие антитела. В отличие от классических моноклональных антител, получаемых в организме животных, они не будут вызывать в организме человека активный антиглобулиновый иммунный ответ, а значит, представляют большой интерес для терапевтического использования.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Езепчук Ю. В. Патогенность как функция биомолекул. М.: Медицина, 1985. 240 с.

Здановский А. Г., Здановская М. В., Янковский Н. К. Структура и функции дифтерийного токсина // Молекуляр. генетика, микробиол. и вирусол. 1988. № 12. С. 3–10.

Основы биохимии / А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит и др. М.: Мир, 1981. Т. 3. 726 с.

Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. М.: Мир, 2000. 581 с.

Щелкунов С. Н. Вирус натуральной оспы — источник новых медицинских препаратов // Соросовский образовательный журн. 1995. № 1. С. 28–31.

Burke K. L., Dunn G., Ferguson M. et al. Antigen chimaeras of polivirus as potential new vaccines // Nature. 1988. Vol. 332. P. 81–82.

Clarke B. E., Newton S. E., Carrol A. R. et al. Improved immunogenicity of a peptide epitope after fusion to hepatitis B core protein // Nature. 1987. Vol. 330. P. 381–384.

Courthey M. Novel serine protease inhibitors obtained by protein engineering // Bull. Inst. Pasteur. 1988. Vol. 86. P. 85–94.

Courtney M., Jallat S., Tessier L.-H. et al. Synthesis in *E. coli* of α_1-antitrypsin variants of therapeutic potential for emphysema and thrombosis // Nature. 1985. Vol. 313. P. 149–151.

Estell D. A., Graycar T. P., Wells J. A. Engineering an enzyme by site-directed mutagenesis to be resistant to chemical oxidation // J. Biol. Chem. 1985. Vol. 260. P. 6518–6521.

Freemont P. S., Ollis D. L., Steitz T. A., Joyce C. M. A domain of the Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I has polymerase but no exonuclease activity // Proteins: Structure, Function, Genetics. 1986. Vol. 1. P. 66–73.

Gangemi J. D., Lazdins J., Dietrich F. M. et al. Antiviral activity of a novel recombinant human interferon-α B/D hybrid // J. Interferon Res. 1989. Vol. 9. P. 227–237.

Hatzenbuhler N. T., Rehberg E. F., Carter J. B. et al. Design and chemoenzymatic synthesis of a tissue plasminogen activator gene with unique restriction sites: a model for studying protein domain function // Nucleosides Nucleotides. 1989. Vol. 8. P. 991–994.

Hoogenboom H. R., de Bruine A. P., Hufton S. E. et al. Antibody phage display technology and its applications // Immunotechnology. 1998. Vol. 4. P. 1–20.

Joyce C. M., Grindley N. D. F. Construction of plasmid that overproduces the large proteolytic fragment (Klenow fragment) of DNA polymerase I of *Escherichia coli* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. Vol. 80. P. 1830–1834.

Kelley V. E., Bacha P., Pankewycz O. et al. Interleukin 2 — diphtheria toxin fusion protein can abolish cell-mediated immunity *in vivo* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. Vol. 85. P. 3980–3984.

Leong D., Coleman K. D., Murphy J. R. Cloned fragment A of diphtheria toxin is expressed and secreted into the periplasmic space of *Escherichia coli* K12 // Science. 1983. Vol. 220. P. 515–517.

Maley J. A., Davidson J. N. The aspartate transcarbamylase domain of a mammalian multifunctional protein expressed as an independent enzyme in *Escherichia coli* // Mol. Gen. Genet. 1988. Vol. 213. P. 278–284.

Murphy J. R., Bishai W., Borowski M. et al. Genetic construction, expression, and melanoma-selective cytotoxicity of diphtheria toxin-related α-melanocyte-stimulating hormone fusion protein // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. Vol. 83. P. 8258–8262.

Oldstone M. B. A., Notkins A. L. Molecular mimicry // Concepts in Viral Pathogenesis II. New York: Springer-Verlag, 1986. P. 195 202.

Parmley S. F., Smith G. P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes // Gene. 1988. Vol. 73. P. 305–318.

Perry L. J., Wetzel R. Disulfide bond engineering into T4 lysozyme: Stabilization of the protein toward thermal inactivation // Science. 1984. Vol. 226. P. 555–557.

Roberts B. L., Markland W., Ley A. C. et al. Directed evolution of a protein: Selection of potent neutrophil elastase inhibitors displayed on M13 fusion phage // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1992. Vol. 89. P. 2429–2433.

Scott J. K., Smith G. P. Searching for peptide ligands with an epitope library // Science. 1990. Vol. 249. P. 386-390.

Seno M., Hinuma S., Onda H., Igarashi K. A hybrid protein between IFN-γ and IL2 // FEBS Lett. 1986. Vol. 199. P. 187–192.

Smith G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface // Science. 1985. Vol. 228. P. 65–66.

Stebbing N. Interferon hybrids: prospects for therapy // Biol. Response Modifiers Human Oncol. and Immunol. New York; London, 1983. P. 23–35.

Stebbing N., May L. Comparisons of dose-response data for various standard and recombinant DNA-derived human interferons // J. Virological Methods. 1982. Vol. 5. P. 309–315.

Vitetta E. S., Krolick K. A., Miyama-Inaba M. et al. Immunotoxins: A new approach to cancer therapy // Science. 1983. Vol. 219. P. 644–650.

Weck P. K., Apperson S., Stebbing N. et al. Antiviral activities of hybrids of two major human leukocyte interferons // Nucl. Acids Res. 1981. Vol. 9. P. 6153–6166.

Wells J. A., Vasser M., Powers D. B. Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites // Gene. 1985. Vol. 34. P. 315–323.

Wilkinson A. J., Fersht A. R., Blow D. M. et al. A large increase in enzyme-substrate affinity by protein engineering // Nature. 1984. Vol. 307. P. 187–188.

Wilson D. R., Finlay B. B. Phage display: Application, innovations, and issues in phage and host biology // Can. J. Microbiol. 1998. Vol. 44. P. 313–329.

Yamaizumi M., Mekada E., Uchida T., Okada Y. One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell // Cell. 1978. Vol. 15. P. 245-250.

Zwarthoff E. C., Gennissen A., Bosveld I. J. et al. Two domains in α interferons influence the efficacy of the antiviral response // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1987. Vol. 147. P. 47–55.

Глава 8
СТАБИЛЬНОСТЬ ГИБРИДНЫХ МОЛЕКУЛ ДНК В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

Бактериальные внехромосомные молекулы ДНК, как и любые другие генетические системы, характеризуются определенной степенью нестабильности. Наиболее хорошо эта проблема изучена для плазмид *E. coli*.

Можно выделить два типа нестабильности плазмид *in vivo*: утрата в процессе деления клеток-хозяев (сегрегационная нестабильность) и изменение структуры (структурная нестабильность).

Находясь в бактериальной клетке, плазмиды с определенной частотой подвергаются спонтанным генетическим изменениям, таким как точечные замены нуклеотидов, делеции, дупликации, инверсии, встройки элементов типа IS (insertion sequence) и Tn (транспозонов). Обычно такие изменения структуры природной плазмиды не дают ей селективных преимуществ в размножении перед исходным вариантом. Это обусловливает достаточно высокую стабильность структуры плазмиды в растущей культуре. Если же изменения приводят в выбранных условиях культивирования к повышению уровня наследования плазмиды клеткой или дают селективное преимущество клеткам, несущим такую плазмиду, то в процессе роста культуры исходная плазмида будет постепенно вытесняться мутантной формой. Когда наличие плазмиды снижает жизнеспособность клетки, популяция будет в процессе роста обогащаться спонтанно появляющимися бесплазмидными клетками.

Стабильность структуры плазмиды и ее поддержание в культуре бактериальных клеток, по-видимому, во многом зависит от окружающих условий. Известно, что при росте на богатых питательных средах плазмидосодержащие и бесплазмидные клетки обычно делятся с одинаковой скоростью. В условиях же лимитирования по какому-либо фактору роста у плазмидосодержащих клеток время генерации, как правило, больше, чем у изогенного бесплазмидного штамма. Вероятно, это обусловлено тем, что плазмида вносит определенные изменения в метаболизм бактериальной клетки, что приводит к появлению дополнительных пищевых потребностей у плазмидосодержащих штаммов. В некоторых случаях при лимитировании размножения культуры по какому-либо фактору роста могут селективно отбираться такие варианты плазмид, в которых нарушены лишь определенные генетические детерминанты. Так, Д. Годвин и Дж. Слэйтер (1979 г.) показали, что при росте популяции клеток *E. coli*, содержащих плазмиду TP120 ($Ap^r Cm^r Tc^r Su^r$), в условиях хемостатного лимитирования по глюкозе избирательно инактивировался ген *tet*. А при недостатке фосфатов плазмида TP120 утрачивалась бактериальными клетками целиком.

В аналогичной работе Д. Ноак с соавторами (1981 г.) обнаружили, что при определенных условиях лимитирования роста по глюкозе или хлориду аммония в некоторых штаммах *E. coli* детерминанта устойчивости к тетрациклину плазмиды pBR325 ($Ap^r Cm^r Tc^r$) может утрачиваться с большей скоростью, чем другие детерминанты этой плазмиды. Интересно, что в таких же условиях плазмида pBR322 ($Ap^r Tc^r$) сохранялась в клетках стабильно.

Изучение поддержания плазмид типа ColE1 при хемостатном лимитировании роста культур по глюкозе или фосфатам показало, что плазмиды pBR322 и pMB9 уже после 30 генераций *E. coli* утрачиваются из значительной части клеток культуры, в то время как плазмиды RP1, pDS4101 и pDS1109 в тех же условиях стабильно сохраняются в клетках и после 120 генераций. Кроме того, в процессе длительного культивирования при недостатке факторов роста копийность плазмид в клетках *E. coli* постепенно снижается, что обусловливает повышенную частоту появления бесплазмидных клеток. Как видим, для более надежного сохранения плазмидосодержащих штаммов *E. coli* необходимо выращивать их на богатых средах.

Разные плазмиды в одних и тех же условиях обладают различной стабильностью. Поэтому, несомненно, структура (генотип) плазмид имеет большое значение в детерминировании стабильности их поддержания в бактериальных клетках. Выявить основные генетические элементы плазмид, влияющие на их стабильность в клетках *E. coli*, позволила серия исследований.

Как известно, плазмиды по способу репликации делят на два типа: со строгим и с ослабленным контролем репликации (см. 2.2.1). Плазмиды первого типа имеют низкую копийность, а плазмиды второго типа находятся в клетках в количестве несколько десятков копий. Если предположить, что плазмиды распределяются по дочерним клеткам случайным образом, то низкокопийные плазмиды должны утрачиваться из клеток растущей популяции с большей частотой по сравнению с высококопийными плазмидами. Однако оказалось, что оба типа природных плазмид одинаково стабильно сохраняются при длительном культивировании плазмидосодержащих клеток *E. coli*. Это указывало на наличие специального механизма равномерного распределения плазмид при делении бактериальных клеток. Действительно, удалось идентифицировать и охарактеризовать плазмидоспецифичные локусы, ответственные за равномерное распределение таких неродственных плазмид, как pSC101, NR1, R1, pCloDF13, F, P1 и др. Данный локус был назван *par* (от англ. partition — разделение), и по своей роли он напоминает центромеру эукариотических хромосом.

П. Мекок и С. Коэн (1980 г.) установили, что в составе плазмиды pSC101 находится участок *par* размером не более 270 пн, который функционирует только в *цис*-положении. Определена нуклеотидная последовательность этого участка и показано, что он имеет палиндромную структуру (содержит инвертированные повторы) и с ним могут связываться определенные белки. В плазмиде pSC101 участок *par* находится около локуса *ori*, но отличен от него и не связан с генами, контролирующими копийность или несовместимость плазмиды.

Введение сегмента ДНК, содержащего *par* pSC101, в состав нестабильных плазмид приводит к стабилизации (хотя и не полной) их наследования. Причем данный эффект проявлялся как на мутантах pSC101 с пониженной стабильностью поддержания, так и на неродственных плазмидах pACYC184, pBR322 и pBR327. Доказано, что в одну и ту же плазмиду *E. coli* можно встроить по крайней мере два гомологичных или гетерологичных участка *par*. Стабильность плазмиды при этом не снижается. Такое поведение отличает *par* от центромер эукариотических хромосом, так как эукариотические хромосомы, содержащие два центромерных участка, очень нестабильны.

У полового фактора F в локусе *par* кроме действующего в *цис*-положении участка ДНК выявили два прилегающих к нему гена, функционирующих в *транс*-положении и кодирующих белки, существенные для процесса разделения молекул плазмид. Полный размер такого локуса *par* составляет 2,8 тпн. *цис*-Действующий элемент локуса *par* состоит из ряда прямых повторов, которые включают более короткие инвертированные повторы (палиндромы). С этой последовательностью связываются плазмидные белки разделения и некоторые белки клетки-хозяина, и такой ДНК-белковый комплекс, названный ***партисомой*** (partisome), обеспечивает правильное распределение плазмид между дочерними клетками, образующимися при делении. Для локуса *par* профага P1, который фактически является низкокопийной плазмидой, обнаружено удивительное сходство в организации с локусом *par* полового фактора F.

Знание полной структуры *par* привело к заключению, что путем встройки всего локуса в состав нестабильно поддерживаемых плазмид можно добиться существенно большего повышения стабильности в клетках *E. coli*, чем при встройке только *цис*-действующего элемента. Данное предположение подтвердилось в эксперименте: показано, что введение полного локуса *par* снижает скорость утраты клетками плазмид по крайней мере в 100 раз по сравнению с его индивидуальным *цис*-действующим элементом.

Чрезвычайно интересный факт обнаружили К. Джердес с соавторами (1986 г.). Оказалось, что один из белков разделения, кодируемый геном *hok* локуса *par*B плазмиды R1, обусловливает гибель клеток *E. coli*, утративших данную низкокопийную плазмиду, и таким образом достигается «стабилизация» поддержания этой плазмиды в бактериальных клетках. Полагают, что в плазмидосодержащих клетках киллерная (убивающая) активность этого белка не проявляется, так как она супрессирована другим плазмидным белком, кодируемым геном *sok* того же локуса *par*B. В клетках, утративших плазмиду, супрессия снимается, возможно, вследствие меньшей стабильности плазмидного белка-супрессора. Экспериментально доказано, что

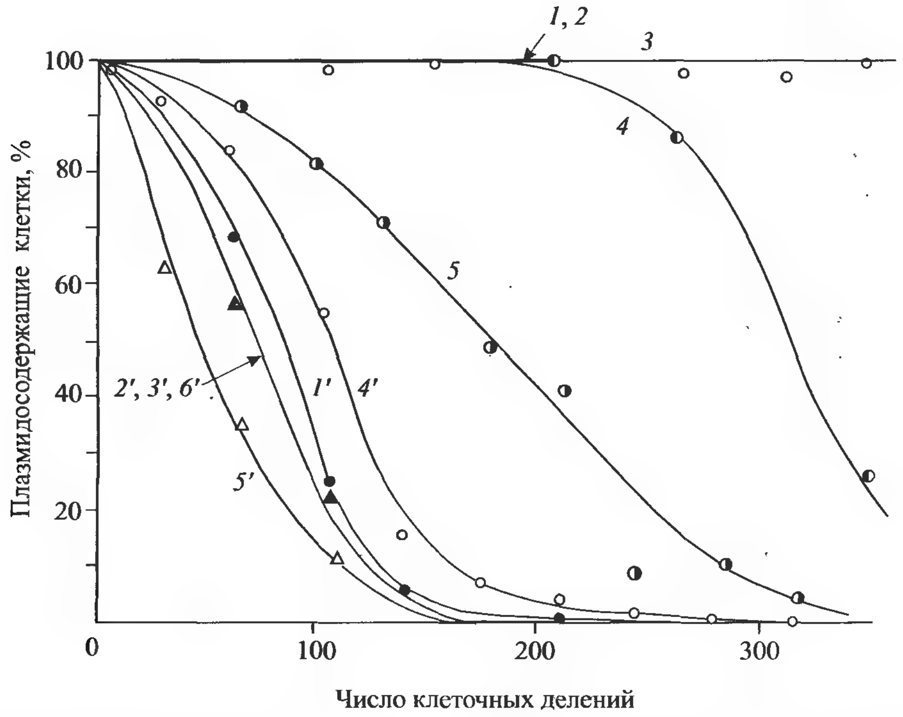


Рис. 8.1. Сохранение плазмид при длительных пересевах индивидуальных клонов *E. coli* CSH54, содержащих плазмиду pBR327 (*1–5*) и pBR322 (*1'* *6'*)

встройка *par*B из плазмиды R1 в производные pBR322 повышает стабильность их поддержания в клетках *E. coli* на три порядка.

Таким образом, процесс равномерного распределения природных плазмид при делении бактериальных клеток контролируется достаточно сложно организованной плазмидной системой *par*, на функционирование которой могут влиять и некоторые гены клетки-хозяина. Во многих векторных плазмидах, созданных в результате генно-инженерных перестроек природных плазмид, *par*-локусы оказались нарушенными или вовсе делетированными. Такие плазмиды в растущей культуре распределяются между дочерними клетками случайным образом, и на стабильность их наследования клетками основное влияние оказывает копийность этих плазмид.

Многие векторные плазмиды *E. coli* получены на основе плазмид типа ColE1, из которых наиболее популярны плазмиды группы pBR и их многочисленные производные. Поэтому стабильность поддержания в *E. coli* как данных векторов, так и гибридных молекул ДНК, созданных на их основе, изучена довольно подробно. В лаборатории С. Н. Щелкунова (1984–1985 гг.) проведен анализ стабильности поддержания в клетках *E. coli* векторных плазмид pBR322 и pBR327. Для этого случайно отобранные клоны трансформантов *E. coli* подвергали длительным пассированиям в богатой жидкой питательной среде без селективного давления по маркерам плазмид и определяли в культуре на разных этапах пассирования долю плазмидосодержащих клеток.

Результаты этих экспериментов показали, что имеется значительная гетерогенность индивидуальных плазмидосодержащих клонов *E. coli* по уровню стабильности наследования плазмид (рис. 8.1). Причем плазмида pBR327 существенно стабильнее поддерживается в клетках *E. coli*, чем pBR322, по-видимому, из-за того, что ее копийность в этих клетках в три раза выше. Необходимо отметить, что оба плазмидных маркера утрачивались клетками одновременно, т. е. плазмида элиминировалась целиком. Время генерации бесплазмидных и плазмидосодержащих клеток в выбранных условиях было одинаковым. Попытки излечить от плазмиды стабильный субклон *E. coli* CSH54[pBR327] № 3 (см. рис. 8.1) с помощью акридинового оранжевого не дали положительных результатов. Плазмиду при этом обнаруживали во внехромосомном состоянии.

Для того чтобы выявить возможные изменения структуры плазмиды в высокостабильном клоне, ее выделили из клеток и провели рестрикционный анализ с помощью мелкощепящей рестриктазы *Bsp*RI. Различий в рестрикционных картинах выделенных плазмидных ДНК и исходной pBR327 не обнаружено. При трансформации клеток *E. coli* CSH54 плазмид-

ной ДНК из стабильных клонов наблюдали обычную гетерогенность трансформантов по признаку стабильности поддержания плазмиды pBR327. Это косвенно подтверждает, что высокая стабильность некоторых вариантов CSH54[pBR327] обусловлена генотипом клеток.

Корреляция между стабильностью поддержания плазмид в клетках *E. coli* и трудностью их элиминирования из этих клеток с помощью интеркалирующих в ДНК агентов обнаружена также в ряде других лабораторий. Возможно, это объясняется появлением спонтанных мутантов *E. coli*, которые нежизнеспособны при отсутствии какого-либо белка, детерминируемого плазмидой. Данное явление может быть использовано для селекции стабильных плазмидосодержащих субклонов *E. coli*. Например, штаммы *E. coli* HB101(*rec*A$^-$) и CSH54(*rec*$^+$), содержащие плазмиду pBR327, пассировали в жидкой среде с акридиновым оранжевым и ампициллином (приблизительно 70 генераций). После этого случайным образом отбирали ряд индивидуальных клонов обоих штаммов. Эти клоны в дальнейшем пассировали в неселективных условиях и анализировали стабильность наследования в них плазмиды. Оказалось, что во всех 10 исследованных клонах *E. coli* HB101 через 13 пассажей, каждый из которых соответствовал 7 генерациям, количество плазмидосодержащих клеток резко снижалось, а через 23 пассажа плазмиду утрачивали почти все клетки. В то же время 5 из 8 клонов *E. coli* CSH54 даже через 35 пассажей устойчиво сохраняли плазмиду. Таким образом, данный подход позволил успешно селектировать стабильные плазмидосодержащие субклоны rec$^+$-штамма *E. coli*. Полученные результаты указывают также на сложность взаимодействия генома плазмид с геномом клетки-реципиента.

Ряд генов *E. coli*, влияющих на стабильность поддержания плазмидных молекул, уже выявлен. Так, для репликации плазмид ColE1-типа необходимы различные факторы клетки-хозяина, в частности ДНК-полимераза I и РНК-полимераза. Мутанты *E. coli*, дефектные по ДНК-гиразе, эндонуклеазам I, III и V, характеризуются повышенной частотой утраты плазмид типа ColE1. Тем не менее о взаимоотношениях плазмиды с клеткой-хозяином известно еще очень мало. Например, найдены штаммы *E. coli*, обеспечивающие стабильное поддержание гибридных плазмид, однако генетическая основа этого явления пока не установлена. Дальнейшие исследования позволят более целенаправленно формировать генотип штамма-реципиента, для того чтобы стабилизировать наследование вводимых в него плазмид.

При конструировании *in vitro* гибридных молекул ДНК и последующем введении их в клетки *E. coli* возникают дополнительные проблемы как со стабильностью наследования этих молекул, так и с устойчивостью их структуры. В частности, встроенный в плазмиду сильный гетерологичный промотор может нарушить поддержание гибридных молекул ДНК в бактерии. Такой эффект обусловлен тем, что интенсивная транскрипция с клонированного промотора подавляет репликацию плазмиды и, следовательно, приводит к снижению ее копийности. Стабилизировать такие гибридные плазмиды удается, если встроить в них терминатор транскрипции в 3′-положении от сильного промотора.

Встройка в многокопийные векторные плазмиды отдельных генов или целых оперонов часто вызывает сверхсинтез их продуктов за счет повышенной дозы гена. В ряде случаев это отрицательно влияет на физиологию бактериальной клетки, что может приводить в процессе роста культуры к утрате гибридной плазмиды или перестройкам в ее структуре (делеции, интеграция IS-элементов и т. п.), которые уменьшают или подавляют экспрессию клонированных генов.

Стабилизировать наследование гибридных плазмид в клетках *E. coli* часто удается, выращивая их в условиях селективного давления по плазмидным маркерам устойчивости к антибиотикам, т. е. в присутствии определенных антибиотиков. При культивировании плазмидосодержащих штаммов в больших объемах такой подход уже малоприемлем вследствие дефицитности антибиотиков и их невысокой стабильности. Более технологичными являются подходы, основанные на автоселекции клеток, содержащих гибридные плазмиды.

Интересный вариант автоселекции плазмидосодержащих клеток предложили П. Ростек и К. Хершбергер (1983 г.). В плазмиду, несущую изучаемый чужеродный ген, встраивают ген белка-репрессора фага λ с термочувствительной мутацией *c*I$_{ts}$857. Штаммы *E. coli*, содержащие такие плазмиды, лизогенизируют дефектным фагом λcI$_{90}$. Лизогенное состояние этого фага поддерживается при температуре 30 °С за счет синтеза белка-репрессора, кодируемого геном *c*I$_{ts}$857 гибридной плазмиды. Утрата плазмиды приводит к прекращению синтеза в клетке белка-репрессора фага, а это влечет за собой индукцию профага λcI$_{90}$ и лизис клетки. Таким

Рис. 8.2. Сохранение плазмид в делящихся клетках *E. coli*, лизогенных по мутанту λcI_{90} (*1*) и нелизогенных (*2–4*) по фагу λ

образом, в растущей культуре в жизнеспособном состоянии поддерживаются только плазмидосодержащие клетки (рис. 8.2).

Недостатком предложенной системы автоселекции является то, что для нее нельзя использовать подходы, связанные с термоиндукцией репликации гибридной плазмиды или транскрипции целевого гена. X. Джилэди с соавторами (1988 г.) сформировали новую систему экспрессии, обеспечивающую столь же эффективную автоселекцию плазмидосодержащих клеток. В гибридную плазмиду pGH50 (рис. 8.3) встроили фрагмент фаговой ДНК, содержащий ген белка-репрессора фага 434. Данный фаг близкородствен фагу λ, но его белок-репрессор взаимодействует с промоторно-операторными областями ДНК фага 434 и не взаимодействует с аналогичными элементами генома фага λ. Экспрессия целевого гена в этой плазмиде находится под контролем сильного промотора p_L фага λ, транскрипция с которого регулируется белком-репрессором cI фага λ (но не фага 434).

Сконструированная плазмида pGH50 вводится в клетки *E. coli*, содержащие криптический профаг (не способный к исключению из бактериальной хромосомы) $\lambda cI_{ts857}\Delta$*Bam*HIΔHI, который обеспечивает синтез термочувствительного репрессора cI фага λ. Затем полученные трансформанты лизогенизируют фагом $\lambda imm^{434}cI_{3003}$, который синтезирует дефектный белок cI фага 434. Сам по себе такой фаг лизогенизировать клетки не способен, но вследствие того что плазмида pGH50 экспрессирует ген *c*I фага 434 дикого типа, в клетках накапливается белок-репрессор фага 434, который связывается с районами p_Lo_L и p_Ro_R на ДНК фага $\lambda imm^{434}cI^-$ и обеспечивает интеграцию фагового генома в бактериальную хромосому. В результате плазмидосодержащие клетки содержат два профага, и в них синтезируется два белка-репрессора — фагов λcI_{ts} и $434cI^+$. Выращивают созданный штамм при температуре не выше 30 °С. Термоиндукция (нагревание культуры до температуры 40–42 °С) приводит к активации транскрипции с промотора p_L фага λ и не сказывается на стабильности поддержания гибридной плазмиды. Спонтанная утрата плазмиды приводит к индукции из профага $\lambda imm^{434}cI^-$ и лизису клеток. За счет такой «стабилизации» и использования сильного термоиндуцируемого промотора удалось добиться высокой продуктивности созданного штамма *E. coli* по гормону роста быка.

К. Мива с сотрудниками (1984 г.) разработали другую систему селекции клеток с гибридной плазмидой, не требующую добавления в среду антибиотиков. В качестве бактерии-хозяина использовали штамм *E. coli* с фенотипом Sm^d (стрептомицинзависимый). Авторы решили выделить ген, обозначенный ими *smd*$^+$, который мог бы в составе плазмиды маскировать фенотип Sm^d и приводить к появлению фенотипа Sm^i (стрептомициннезависимый). Для этого в состав pBR322 встраивали *Bam*HI-фрагменты хромосомной ДНК штамма *E. coli*, не имеющего фенотипа Sm^d. Полученной смесью трансформировали *E. coli* Sm^d и отбирали клоны с фенотипом Ap^rSm^i. В результате был выделен фрагмент, содержащий искомый ген *smd*$^+$. Оказалось, что он является геном *rps*L, кодирующим рибосомный белок S12. Встройка гена *rps*L в любую гибридную плазмиду обеспечивала ее стабильное поддержание в *E. coli* Sm^d на среде без стрептомицина (бесплазмидные клетки на такой среде не растут, а жизнеспособность сохраняют только клетки, несущие гибридные плазмиды с целевыми генами и геном *rps*L).

Рассмотренные подходы позволяют достаточно просто и экономично осуществлять в растущей культуре автоселекцию клеток, содержащих гибридные плазмиды. Поскольку при этом клетки, утратившие плазмиду, погибают, скорость роста культуры обычно снижена. Но за счет того, что 100 % клеток в культуре несут гибридную плазмиду, «стабилизированные» штаммы-продуценты могут быть достаточно эффективными и перспективными для технологии.

На стабильность поддержания гибридных ДНК *in vivo* большое влияние оказывает их макроструктура (суперспирализация, мультимери-

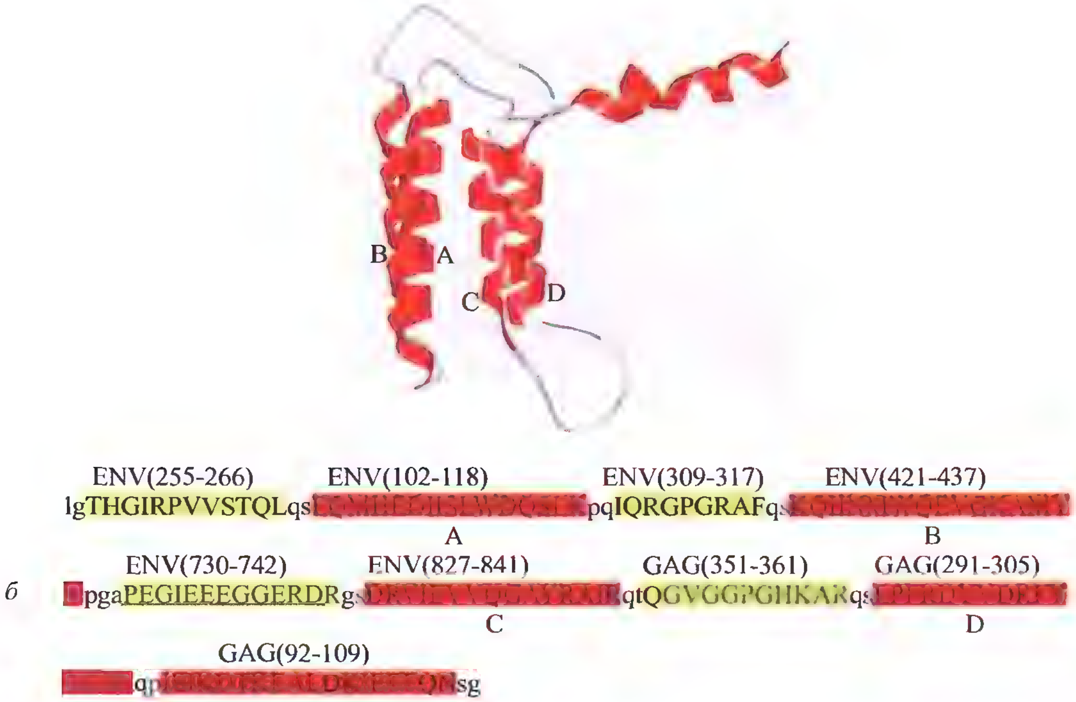


Рис. 6. Модель третичной структуры (*а*) и аминокислотная последовательность (*б*) белка TBI. Локализация Т- и В-эпитопов в белках ENV и GAG HIV-1 показана над последовательностью. Т-клеточные эпитопы A, B, C, D (α-спиральные районы) отмечены красными блоками, В-клеточные эпитопы — зелеными

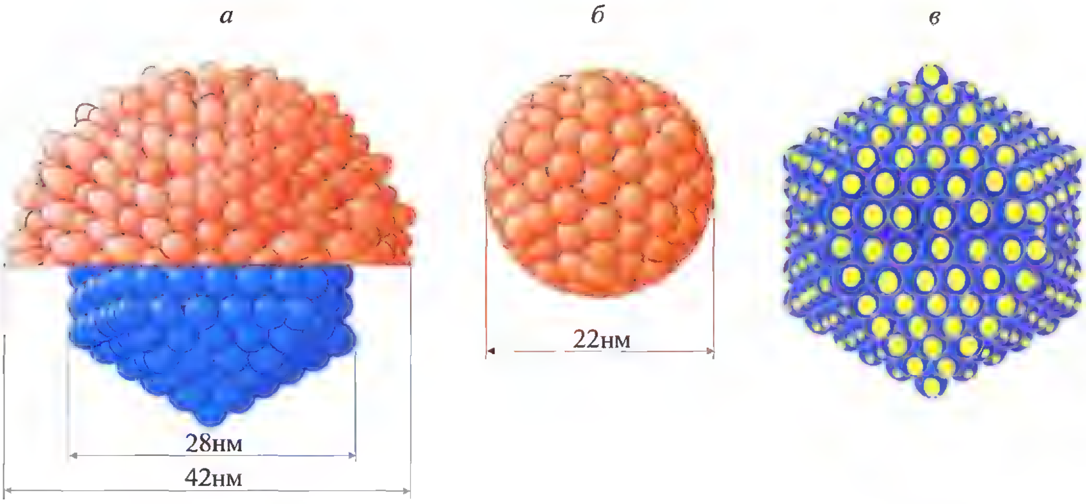


Рис. 7. Схема строения вируса гепатита В (*а*), частиц, образуемых поверхностным антигеном (*б*), и сердцевиноподобных частиц, образуемых химерным белком (*в*)

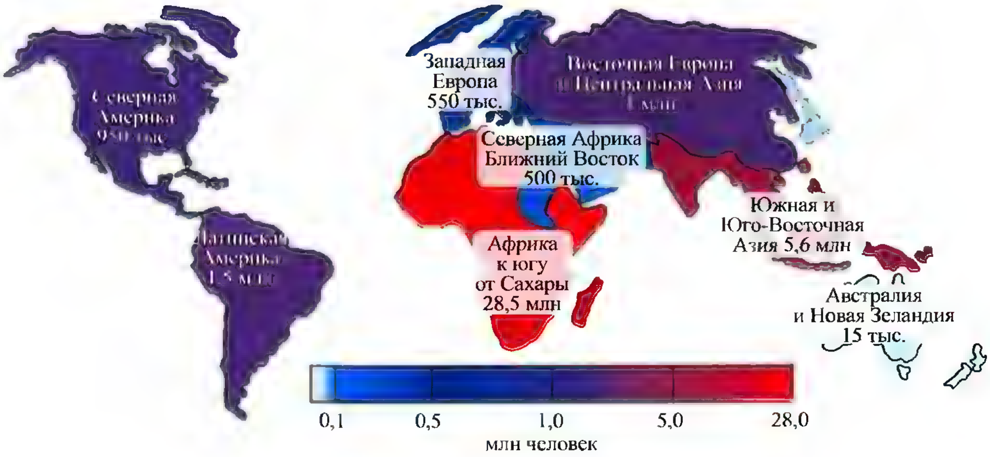


Рис. 8. Глобальное распространение HIV-инфекции.
Указано число инфицированных людей, лишь часть из которых в настоящее время больны СПИДом

Рис. 9. Глобальная распространенность субтипов вируса иммунодефицита человека.
Субтипы HIV-1 выделены красным цветом, HIV-2 — зеленым. Прописными буквами обозначены субтипы, наиболее часто встречаемые в конкретном регионе

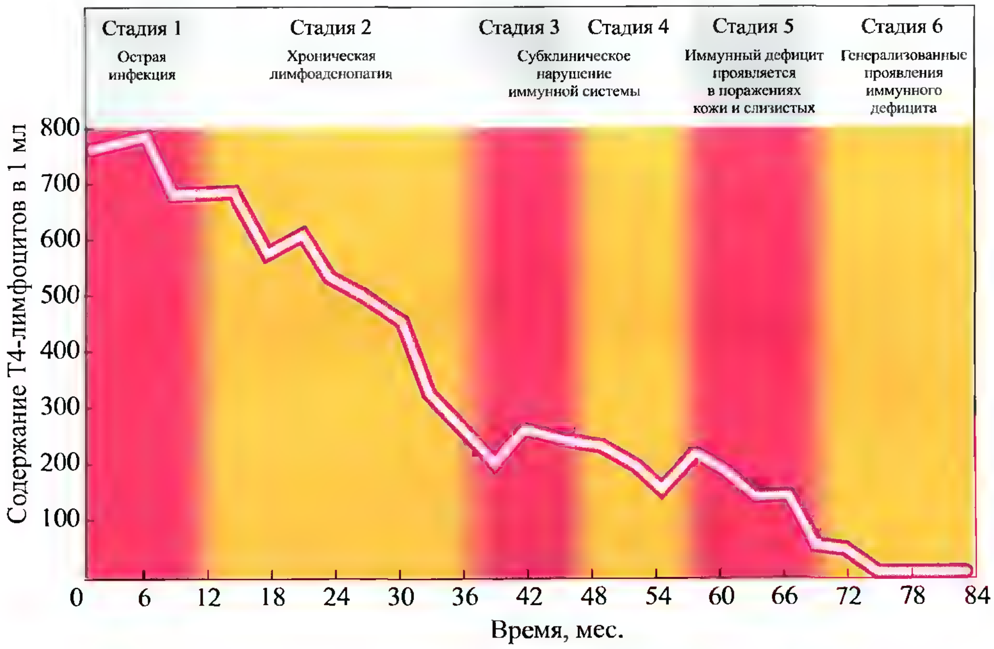


Рис. 10. Динамика содержания Т4-лимфоцитов в крови пациента с типичным течением СПИДа

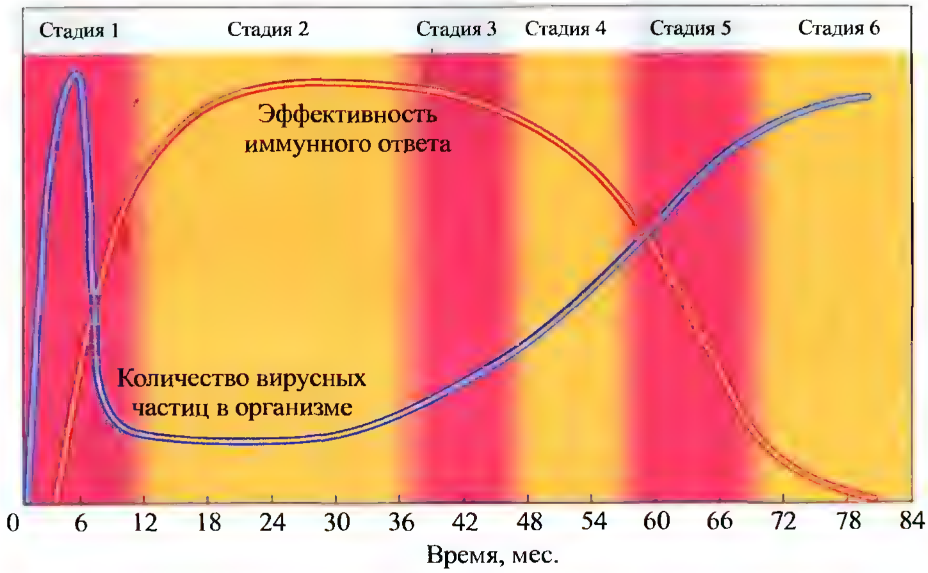


Рис. 11. Соотношение между продукцией HIV и уровнем суммарного (гуморального и клеточного) иммунного ответа организма человека в ходе HIV-инфекции

Рис. 12. Регенерация растений табака из каллуса листовых дисков на селективной среде

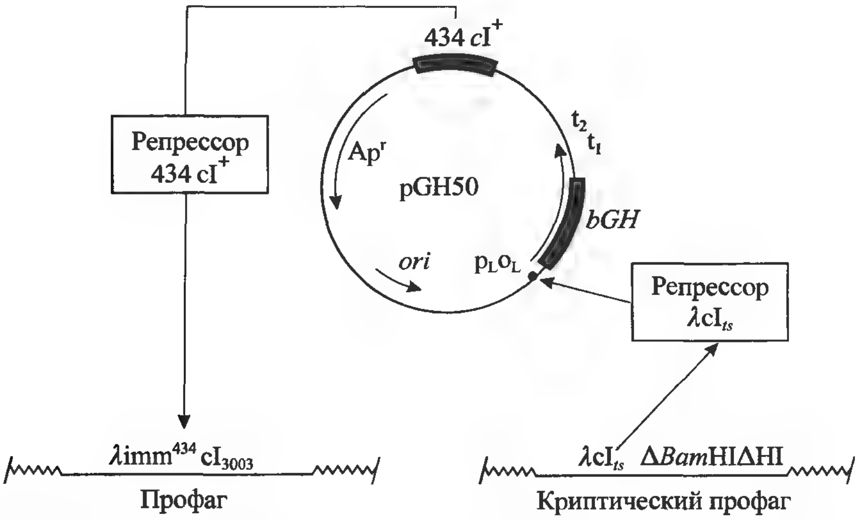


Рис. 8.3. Система плазмида–клетка, обеспечивающая термоиндукцию транскрипции с промотора λp_L и автоселекцию плазмидосодержащих клеток

зация и др.). В частности, встройка чужеродных фрагментов ДНК иногда значительно изменяет макроструктуру (топологию) плазмиды, что отрицательно сказывается на ее репликации и стабильности наследования. Однако в результате спонтанно возникающих *in vivo* делеций могут образовываться и устойчиво наследуемые варианты гибридных плазмид. Необходимо отметить, что встройка в плазмиды чужеродных фрагментов ДНК не всегда отражается на стабильности поддержания плазмид в *E. coli*. В ряде случаев чужеродные фрагменты ДНК, в несколько раз превосходящие по размеру векторную плазмиду, могут стабильно сохраняться в гибридной молекуле.

Известно, что в молекулах ДНК фагов, плазмид, бактериальных хромосом имеются короткие инвертированные повторы длиной 9–13 пн. Такие палиндромные структуры могут стабилизировать суперкольцевую форму ДНК, а также представлять собой участки взаимодействия ДНК с белками клетки. Более протяженные инвертированные повторы в ДНК плазмид и фагов могут значительно изменять топологию этих молекул *in vivo*, нарушая механизм регуляции транскрипции и репликации. Протяженные инвертированные повторы, как правило, или выщепляются из гибридных молекул ДНК с высокой частотой, или обусловливают летальность конструируемых *in vitro* молекул.

Японские исследователи подробно изучили влияние повторов средней длины на стабильность плазмид в клетках *E. coli*. Оказалось, что состыкованные инвертированные повторы длиной 100–150 пн могут сохраняться в составе плазмид, реплицирующихся в клетках *E. coli* дикого типа. При встройке прилежащих друг к другу инвертированных повторов большей длины плазмиды, как правило, не способны реплицироваться в клетках дикого типа, но реплицируются во множественных мутантах по системе рекомбинации типа *E. coli recB*rec*C*sbc*B*rec*F*. Однако и в последнем случае наблюдаются делеции в районе встроенного палиндрома. Введение достаточно протяженной последовательности между инвертированными повторами позволяет заметно стабилизировать наследование клетками плазмид.

Прямые (тандемные) повторы средней длины, по-видимому, более устойчиво сохраняются в структуре гибридных молекул ДНК, чем инвертированные. В то же время протяженные тандемные повторы в составе гибридных ДНК характеризуются высокой степенью нестабильности. Выщепление повторяющихся последовательностей происходит в результате внутримолекулярной или межмолекулярной рекомбинации гибридной ДНК и зависит, хотя и не полностью, от системы рекомбинации бактериальной клетки.

Стабильность наследования многокопийных плазмид типа ColE1 может быть значительно снижена в результате мультимеризации плазмид за счет гомологичной рекомбинации. Поэтому важным моментом стабилизации таких плазмид является использование штаммов *E. coli*, детерминирующих функции сайтспецифической рекомбинации мультимерных плазмид и перевода их в мономерную форму. При этом плазмида должна содержать особую последовательность *cer* (279 пн для ColE1), по которой проходит сайтспецифическая рекомбинация.

Д. Томас с сотрудниками (1987 г.) установили, что в клетках *E. coli*, иммобилизованных на гранулах геля, стабильность наследования плазмид может быть заметно выше, чем в свободных клетках в тех же условиях непрерывного культивирования.

Таким образом, при клонировании чужеродных фрагментов ДНК в составе внехромосомных векторов *E. coli* нужно учитывать целый спектр параметров, влияющих на стабильность гибридных молекул в бактериальной клетке. Предпочтительно в качестве реципиентов гибридных ДНК использовать штаммы *E. coli*, дефектные по системе общей рекомбинации и поддерживающие плазмиды в мономерной форме. При конструировании гибридных молекул ДНК желательно избегать появления в их составе прямых или инвертированных повторов. Выращивать культуры *E. coli* целесообразно на богатых средах с использованием факторов селективного отбора плазмидосодержащих клеток.

Большое значение при технологическом использовании таких штаммов имеет правильный выбор условий их культивирования. Оптимальными будут условия, в которых достигается наибольший выход целевого продукта при наименьшей скорости потери плазмиды или инактивации клонированных генов. В определении таких оптимальных условий решающую роль играют методы математического моделирования биотехнологических процессов.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Потапова И. А., Репин В. Е., Щелкунов С. Н. Стабильность поддержания векторных плазмид pBR322 и pBR327 в клетках *Escherichia coli* при множественных пересевах // Генетика. 1985. Т. 21. С. 344–346.

Щелкунов С. Н. Конструирование гибридных молекул ДНК. Новосибирск: Наука, 1987. 168 с.

Amster O., Zamir A. Sequence rearrangements may alter the *in vivo* superhelicity of recombinant plasmids // FEBS Lett. 1986. Vol. 197. P. 93–98.

Boe L., Gerdes K., Molin S. Effect of genes exerting growth inhibition and plasmid stability on plasmid maintenance // J. Bacteriol. 1987. Vol. 169. P. 4646–4650.

De Taxis du Poet P., Arcand Y., Bernier R. et al. Plasmid stability in immobilized and free recombinant *Escherichia coli* JM105 (pKK223-200): importance of oxygen diffusion, growth rate, and plasmid copy number // Appl. Environ. Microbiol. 1987. Vol. 53. P. 1548–1555.

Gerdes K., Rasmussen P. B., Molin S. Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmidfree cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. Vol. 83. P. 3116–3120.

Giladi H., Koby S., Oren R. Selective stabilization by the bacteriophage 434 repressor of the plasmid expressing bovine growth hormone in *Escherichia coli* // Appl. Environ. Microbiol. 1988. Vol. 54. P. 1297–1299.

Lopilato J., Bortner S., Beckwith J. Mutations in a new chromosomal gene of *Escherichia coli* K-12, *pcn*B, reduce plasmid copy number of pBR322 and its derivatives // Mol. Gen. Genet. 1986. Vol. 205. P. 285–290.

Mori H., Kondo A., Ohshima A. et al. Structure and function of the F plasmid genes essential for partitioning // J. Mol. Biol. 1986. Vol. 192. P. 1–15.

Nakamura Y., Yoshimura H., Yoshino T. et al. Biological characters of palindromic DNA // J. Gen. Appl. Microbiol. 1986. Vol. 32. P. 13–23.

Nasri M., Sayadi S., Barbotin J. N., Thomas D. The use of the immobilization of whole living cells to increase stability of recombinant plasmids in *Escherichia coli* // J. Biotechnology. 1987. Vol. 6. P. 147–157.

Nishimura N., Komatsubara S., Kisumi M. Increased production of aspartase in *Escherichia coli* K-12 by use of stabilized aspA recombinant plasmid // Appl. Environ. Microbiol. 1987. Vol. 53. P. 2800–2803.

Nishimura N., Komatsubara S., Taniguchi T., Kisumi M. Hyperproduction of aspartase of *Escherichia coli* K-12 by the use of a runaway plasmid vector // J. Biotechnology. 1987. Vol. 6. P. 31–40.

Stirling C. J., Stewart G., Sherratt D. J. Multicopy plasmid stability in *Escherichia coli* requires host-encoded functions that lead to plasmid site-specific recombination // Mol. Gen. Genet. 1988. Vol. 214. P. 80–84.

Subia N. L., Kogoma T. Concatamer formation of ColE1-type plasmids in mutants of *Escherichia coli* lacking RNase H activity // J. Mol. Biol. 1986. Vol. 189. P. 389–399.

Van Putten A. J., Lang R. de, Suter C. P., Nijkamp H. J. *Escherichia coli* host G668 stabilizes plasmids that are unstable in other *Escherichia coli* strains // Curr. Microbiol. 1987. Vol. 15. P. 199–202.

Yoshimura H., Yoshino T., Hirose T. et al. Biological characteristics of palindromic DNA (II) // J. Gen. Appl. Microbiol. 1986. Vol. 32. P. 393–404.

Глава 9
ВЕКТОРНЫЕ СИСТЕМЫ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ, НЕ ОТНОСЯЩИХСЯ К РОДУ *ESCHERICHIA*

Разные представители почвенных и водных грамотрицательных бактерий проявляют огромное многообразие метаболических активностей, которые не только представляют значительный научный интерес, но и потенциально важны для биотехнологии. Однако ряд этих активностей нельзя воспроизвести в клетках *E. coli*, несущих в составе гибридных молекул ДНК соответствующие генетические детерминанты, так как метаболические и физиологические возможности этой бактерии ограничены. Кроме того, исследования последних лет показали, что, несмотря на фундаментальную схожесть организации генетического аппарата прокариот и способа реализации генетической информации, существуют характерные для каждой таксономической группы особенности, отличающие ее от других групп по тонким механизмам регуляции экспрессии генов. Это может приводить к тому, что гены бактерий одного семейства (рода) не будут экспрессироваться в клетках бактерий другого семейства (рода) или обусловят очень низкий уровень продукции соответствующего белка. Поэтому для изучения экспрессии генов, получения суперпродуцентов с определенными свойствами и т. п. необходимо либо создавать для каждой таксономической группы бактерий специализированную векторную систему на основе плазмид и фагов (ярким примером такого подхода является *E. coli*), либо разрабатывать универсальные векторные системы для относительно широкого спектра неродственных бактерий с использованием плазмид, имеющих широкий круг хозяев.

Создавая на основе природного репликона удобные клонирующие векторы, необходимо прежде всего достаточно подробно изучить генетическую организацию данной автономно реплицирующейся молекулы ДНК и лишь затем выполнить ряд манипуляций по ее реконструкции. На получение каждого такого вектора, как правило, уходит много времени. Особенно это касается слабо изученных в генетическом плане видов бактерий. Поэтому крайне привлекательным выглядит подход, который предусматривает создание векторных молекул, способных стабильно реплицироваться в различных хозяевах. По сравнению с конструированием отдельных молекулярных векторов для каждого бактериального вида это, во-первых, существенно экономит время и, во-вторых, обеспечивает возможность изучать экспрессию любых генов в различном генетическом окружении в составе одной и той же генетической конструкции. Часто в этой схеме экспериментов грамотрицательная бактерия *E. coli*, как наиболее хорошо разработанная генно-инженерная система, используется в качестве промежуточного хозяина.

9.1. ПЛАЗМИДЫ ШИРОКОГО КРУГА ХОЗЯЕВ

В настоящее время расшифрованы полные нуклеотидные последовательности более 200 природных плазмид. Копийность плазмид может существенно варьировать — от 1 до 200 молекул на клетку. В ряде случаев бактерии содержат одновременно несколько типов плазмид, различающихся по размеру и нуклеотидной последовательности. Важное свойство плазмид состоит в том, что они способны самостоятельно реплицироваться *in vivo*, т. е. являются ***репликонами***. При этом у одних плазмид репликация строго зависит от соответствующих ферментных систем бактерий, в других же случаях плазмида кодирует белки, которые обеспечивают относительную автономность ее репликации.

Внехромосомные генетические элементы могут придавать бактериальным клеткам дополнительные свойства, выявляемые фенотипически. Это связано с тем, что они могут содержать

Таблица 9.1. **Примеры устойчивости клеток к антибиотикам и токсическим веществам, детерминируемой плазмидами**

Обозначение фенотипа	Вещество	Обозначение генотипа	Фермент, обусловливающий устойчивость
1	2	3	4
Ac	Акридин	*acr*	—
Ak	Амикацин	*aac*A	Аминогликозид-6′-N-ацетилтрансфераза
		*aac*C	Аминогликозид-3-N-ацетилтрансфераза
		*aad*C	Аминогликозид-4′-аденилилтрансфераза
Ap	Ампициллин	*bla*	β-Лактамаза
Asa	Арсенат	*asa*	—
Asi	Арсенит	*asi*	—
Bi	Ионы висмута	*bis*	—
Bt	Бутирозин	*aph*A	Аминогликозид-3′-фосфотрансфераза
Cb	Карбенициллин	*bla*	β-Лактамаза
Cd	Ионы кадмия	*cad*	—
Ce	Цефалексин	*bla*	β-Лактамаза
Cl	Клиндамицин	*erm*	—
Cm	Хлорамфеникол	*cat*	Хлорамфениколацетилтрансфераза
Co	Ионы кобальта	*cob*	—
Cp	Цефалоспорин	*bla*	β-Лактамаза
Cr	Цефалоридин	*bla*	То же
Cx	Клоксациллин	*bla*	— « —
Dm	3′,4′-Дидезоксиканамицин B	*aac*A	Аминогликозид-6′-N-ацетилтрансфераза
		*aac*B	Аминогликозид-2′-N-ацетилтрансфераза
		*aac*C	Аминогликозид-3-N-ацетилтрансфераза
		*aad*B	Аминогликозид-2″-N-аденилилтрансфераза
Eb	Этидиум бромид	*ebr*	—
Em	Эритромицин	*erm*	Метилаза рибосомной РНК
Gm	Гентамицин	*aac*A	Аминогликозид-6′-N-ацетилтрансфераза
		*aac*B	Аминогликозид-2′-N-ацетилтрансфераза
		*aac*C	Аминогликозид-3-N-ацетилтрансфераза
		*aad*B	Аминогликозид-2″-N-аденилилтрансфераза
Hg	Ионы ртути	*mer*	—
Km	Канамицин	*aph*A	Аминогликозид-3′-фосфотрансфераза
		*aac*A	Аминогликозид-6′-N-ацетилтрансфераза
		*aac*B	Аминогликозид-2′-N-ацетилтрансфераза
		*aac*C	Аминогликозид-3-N-ацетилтрансфераза
		*aad*B	Аминогликозид-2″-N-аденилилтрансфераза
		*aad*C	Аминогликозид-4′-аденилилтрансфераза
Lv	Ливидомицин	*aph*A	Аминогликозид-3′-фосфотрансфераза
		*aac*B	Аминогликозид-2′-N-ацетилтрансфераза
		*aac*C	Аминогликозид-3-N-ацетилтрансфераза
Mc	Метициллин	*bla*	β-Лактамаза
Nm	Неомицин	*aph*A	Аминогликозид-3′-фосфотрансфераза
		*aac*A	Аминогликозид-6′-N-ацетилтрансфераза
		*aac*B	Аминогликозид-2′-N-ацетилтрансфераза
		*aac*C	Аминогликозид-3-N-ацетилтрансфераза
Ox	Оксациллин	*bla*	β-Лактамаза
Pm	Парамомицин	*aph*A	Аминогликозид-3′-фосфотрансфераза
		*aac*B	Аминогликозид-2′-N-ацетилтрансфераза
		*aac*C	Аминогликозид-3-N-ацетилтрансфераза

Окончание табл. 9.1

1	2	3	4
Pn	Пенициллин	*bla*	*β*-Лактамаза
Rm	Рибостамицин	*aph*A	Аминогликозид-3′-фосфотрансфераза
		*aph*B	Аминогликозид-5′′-фосфотрансфераза
		*aac*B	Аминогликозид-2′-N-ацетилтрансфераза
		*aac*C	Аминогликозид-3-N-ацетилтрансфераза
Sb	Ионы сурьмы	*ant*	—
Sm	Стрептомицин	*aph*C	Аминогликозид-3′′-фосфотрансфераза
		*aad*A	Аминогликозид-3′′-аденилилтрансфераза
Sp	Спектиномицин	*aad*A	То же
Su	Сульфаниламид	*sul*	—
Tc	Тетрациклин	*tet*	—
Tm	Тобрамицин	*aac*A	Аминогликозид-6′-N-ацетилтрансфераза
		*aac*B	Аминогликозид-2′-N-ацетилтрансфераза
		*aac*C	Аминогликозид-3-N-ацетилтрансфераза
		*aad*B	Аминогликозид-2′′-N-аденилилтрансфераза
		*aad*C	Аминогликозид-4′′-аденилилтрансфераза
Tp	Триметоприм	*dfr*	Дигидрофолатредуктаза

детерминанты устойчивости (табл. 9.1) к антибиотикам и токсическим веществам (R-плазмиды, от англ. resistance — устойчивость), нести гены, контролирующие катаболизм (деградацию) некоторых органических соединений, не являющихся источниками углерода и энергии для большинства микроорганизмов (D-плазмиды, или плазмиды биодеградации), направлять синтез токсинов, бактериоцинов, антибиотиков и др. Плазмиды, не выявляемые фенотипически, называют ***криптическими***.

Многие плазмиды, имеющие размер более 40 тпн, обладают способностью к конъюгационному переносу. ***Конъюгацией*** называется процесс переноса генетической информации от клетки-донора к клетке-реципиенту, который осуществляется при непосредственном контакте клеток между собой. По этому признаку плазмиды делят на трансмиссивные и нетрансмиссивные (конъюгативные и неконъюгативные).

Конъюгационный перенос плазмид обеспечивается большим набором генов, которые объединяются в *tra*-оперон. Продукты этих генов необходимы для осуществления двух основных этапов процесса конъюгации: 1) образования скрещивающихся пар; 2) переноса и репликации ДНК. Для образования скрещивающихся пар необходимы половые ворсинки — пили, формирующиеся на поверхности донорных клеток. От донора к реципиенту переносится только одна цепь плазмидной ДНК, начиная со специфического участка *ori*T (от англ. transfer — перенос). С участием продукта плазмидного гена происходит разделение цепей ДНК, необходимое для переноса и синтеза комплементарных цепей ДНК как в клетке донора, так и в клетке реципиента. Завершается этот процесс формированием кольцевых двухцепочечных молекул ДНК плазмиды.

Нетрансмиссивные плазмиды не содержат детерминант, придающих бактериальным клеткам свойства генетических доноров, и поэтому они не способны самостоятельно передаваться от одних клеток к другим. Однако такие плазмиды в ряде случаев могут быть перенесены в реципиентные клетки с помощью конъюгативных плазмид. Такой процесс называется ***мобилизацией*** плазмиды. Известно два механизма мобилизации нетрансмиссивных плазмид:

1. Перенос за счет белковых продуктов генов *tra*-оперона конъюгативной плазмиды, находящейся в этой же клетке. Такой перенос начинается с собственного участка *ori*T мобилизуемой плазмиды, и для его осуществления необходимо наличие на этой плазмиде генов *mob* (mobilization). Так происходит мобилизация плазмид ColE1 и RSF1010. При этом конъюгативная плазмида-помощник в реципиентную клетку может и не проникать.

2. Перенос в составе коинтегрантов с конъюгативными плазмидами. ***Коинтегрант*** представляет собой кольцевую молекулу ДНК, в которой объединены два или более репликона, способных к независимой репликации. При определенных условиях коинтегранты диссоциируют на дискретные плазмидные репликоны.

Изучение разных плазмид показало, что некоторые из них не способны стабильно сосуще-

Таблица 9.2. **Группы несовместимости плазмид, установленные в *E. coli***

Группа	Тип пилей	Пилеспецифические фаги	Плазмиды
B	B	fd	R16, Tp113, Tp125, R723, R864a
C	C	C-1, C-2, J	R40a, R55, RA1, pIP55, pIP40a, pHH1343a
D	D	fd, f711, J	R711b, R778b
E			JA4320
FI	F	f1, f2, MS2, Qβ, fd, M13, R17	F, ColV2, ColV2-K94, ColV3, ColV3-K90, ColV3-K30, R162, R386, R453, R455, R773, P307Ent, pIP162, pAP10-2, pIP174, pHH507, RGH2387
FII	То же	То же	R1, R6, R136, R192, R1-19k, R538Fdrd1, NR1, R1drd19, R6-5, SF119, pHH1313b, pGD10
FIII	— « —	— « —	ColB-K98, MIP240Hly, R.ColBM
FIV	— « —	— « —	R124, pJL1 (Vir), pAP20
FV	— « —	f1, fd, UA6	F_0lac, pIE509, pIE510
FVI	— « —	MS2	Hly-P212, pGL611, pSU212Hly, pSU105Hly
FVII	— « —	То же	pAP38
FVIII	— « —	— « —	pAP43
FIX	— « —	— « —	pAP42
FX	— « —	« —	pAP19-1
G			Rms149
HI1			R27, R726, pPG1251-2
HI2			R478, pAS251-2, pSD114, N-1, pWR23
HI3			MIP233
HII			pHH1457, pHH1508a, pHH1532b-1
I1/Iα	I	If1, If2, PR64FS	R62, R64, R144, R483, ColIb-P9
Iγ	То же	То же	R621a, ColIb-Im1420
Iδ	— « —	— « —	JR66a, R721
Iτ	— « —	— « —	R905a
I2	— « —	— « —	TR114, R769, pHly152
J	J	J	R391, R997
K	K		R387, pTM559, pIE316, pKMR
M	M	X	R46, R69, R390, R446b, R471a, R831b, pDT201
N	N	Ike, PR4, X, PRD1	N3, N3T, R15, R46, R477b, pKM101, PCU1
P	P	PRRR1, PR1, Ike, PRD1	R18, R68, R690, R751, RP1, RP4, RK2, pUZ8
Q			R678, R702, R839, R938, R995, R1162, NPT7, R300B, NTP2, RSF1010, pKT214
S			R751, R772, R906, R1033
T	T	Pil/R1, t	Rts-1, R394, R401, R492
U		X	pAr-32, RA3, R1460, pIE420
V	V		R753, R757
W	W	PR4, X, PRD1	Sa, R7K, R388
X	X	X	R6K, R485, TP228, TP231, TR227, R711b, TEMdrd
Y	W		PIcm, P7, R753, R905, P15B, pIP2311

ствовать в клетке. Данное явление названо ***несовместимостью плазмид***. По этому признаку плазмиды разного происхождения распределены на группы несовместимости — Inc-группы (от англ. incompatibility — несовместимость). К одной группе обычно относят плазмиды, которые несовместимы между собой, но совместимы с любой плазмидой из других групп.

Большинство известных плазмид, трансмиссивных в *E. coli*, классифицировано путем определения их несовместимости в бактериях этого вида (табл. 9.2). По мере открытия и изучения новых плазмид выявляются новые группы несовместимости. Когда плазмиды нетрансмиссивны в *E. coli*, их классифицируют в бактериях тех видов, в которых они найдены. Напри-

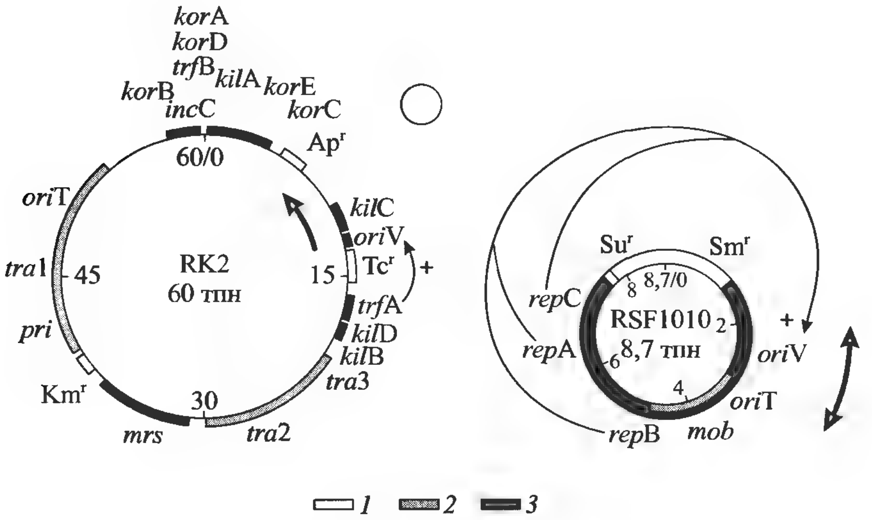


Рис. 9.1. Генетические карты плазмид RK2 и RSF1010:

1 — гены устойчивости к антибиотикам; *2* — области, ответственные за перенос плазмид; *3* — области, вовлеченные в репликацию и поддержание плазмид.
Тонкими стрелками показана положительная регуляция репликации плазмидных ДНК, толстыми указано направление репликации. Малая окружность вверху показывает размер RSF1010 в одном масштабе с RK2

мер, подробно изучены по признаку несовместимости плазмиды псевдомонад, стафилококков. Плазмиды, относящиеся к одной Inc-группе, обладают, как правило, многими сходными признаками и часто обнаруживают значительную гомологию ДНК.

Большой интерес для молекулярных биологов представляют плазмиды с широким кругом хозяев, способные реплицироваться в бактериях, относящихся к разным видам. В то время как многие плазмиды грамположительных бактерий обладают этим свойством (в пределах группы грамположительных бактерий), среди плазмид грамотрицательных бактерий явление стабильного поддержания в разных хозяевах менее распространено и в основном связано с плазмидами групп несовместимости *E. coli* C, N, P, Q и W (см. табл. 9.2). Наиболее подробно в этом плане изучены плазмиды, относящиеся к группам несовместимости P и Q (по классификации плазмид псевдомонад они принадлежат к группам несовместимости *Pseudomonas* IncP-1 и IncP-4 соответственно). Плазмиды группы IncP крупные (53–87 тпн), конъюгативные и низкокопийные (4–7 копий на хромосому *E. coli* или 3 копии на хромосому *Pseudomonas aeruginosa*), в то время как IncQ-плазмиды относительно малы (8,7–9,5 тпн), нетрансмиссивны (хотя эффективно мобилизуются, особенно плазмидами группы IncP) и имеют более высокую копийность (10–12 в *E. coli* и такую же или выше в *P. aeruginosa*). Используя конъюгационно-транспортную систему IncP, плазмиды групп IncP и IncQ способны передаваться в грамотрицательные бактерии всех родов и реплицироваться в них. Исключение составляют бактерии рода *Bacteroides*, в клетки которых плазмиды переносятся, но не способны в них реплицироваться. Таким образом, рассматриваемые плазмиды имеют чрезвычайно широкий круг хозяев. В группе IncP наиболее изучены плазмиды RK2, RP1, RP4, R68 и R18. Полагают, что они являются разными изолятами одной и той же плазмиды, и за архетип этих плазмид принята RK2. Наиболее изученные плазмиды группы IncQ — RSF1010, R300B и R1162. Они также определены как изоляты одной плазмиды, и в качестве архетипа используется RSF1010.

Плазмиды RK2 и RSF1010 существенно различаются по генетической организации (рис. 9.1). Репликация RK2 происходит с участка *ori*V (от англ. vegetate — расти) однонаправленно, в то время как репликация RSF1010 осуществляется в двух направлениях и инициируется также с соответствующего участка *ori*V. В RK2 единственным геном, продукт которого необходим для репликации плазмидной ДНК, является ген *trf*A. Показано, что в зависимости от хозяина, в котором находится RK2, происходит синтез белка TrfA размером 32 кДа или 43 кДа. По-видимому, это обеспечивает гибкость взаимодействия белка TrfA с факторами репликации бактериальной клетки и обусловливает возможность репликации плазмиды во всем многообразии клеток-хозяев. Ген *trf*B кодирует репрессор гена *trf*A и играет важную роль в регуляции репликации и поддержания плазмиды RK2 *in vivo*.

		–35	–10	
а		TTGACA	TATAAT	+1
б	***trf*A**	TTCTTGACAGCGGAACCAATGTTTAGCTAAACTAGAGTCTCCT		
в	***trf*B**	GTTGTTGACGTGCGAGAAATGTTTAGCTAAACTTCTCTCATGT		
г	***kil*A**	GTGTTGACGATTTATAGAAAGTTTAGCTAAACTTCTTCCATCG		
д	***kil*B**	AGGGCTTGCACTTCCTTCTTTAGCCGCTAAAACGGCCCCTTCC		
е	***rep*A**	CCATTGTTAATGTGCTGTCTCGTAGGCTATCATGGAGG		
ж	***rep*B**	TAGTGCTTGCTTGGTACTCACGCCTGTTATACTATGAG		
з	***rep*C**	GGTAGTGACCCCGCCAGCGCCTAACCACCAACTGCCTC		
				+1

Рис. 9.2. Структура промоторов широкого круга хозяев:

а — области –10 и –35 «усредненного» промотора *E. coli*; *б–д* — промоторы генов плазмиды RK2; *е–з* — промоторы плазмиды RSF1010.
+1 — точка начала транскрипции

Плазмида RSF1010 несет три гена (*rep*A, *rep*B, *rep*C), продукты которых являются положительными регуляторами процесса ее репликации и обеспечивают независимость от многих функций репликации бактерии-хозяина. По-видимому, благодаря такой генетической организации плазмида RSF1010 способна эффективно реплицироваться в большинстве видов грамотрицательных бактерий и, как следствие, обладает в них высокой копийностью.

Важным свойством RK2 и RSF1010 является то, что их гены имеют так называемые промоторы широкого круга хозяев (рис. 9.2), несколько отличающиеся по структуре консервативных районов от соответствующих районов промоторов *E. coli*.

9.2. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ ПЛАЗМИД ГРУППЫ НЕСОВМЕСТИМОСТИ IncQ

Ферментный аппарат репликации плазмид группы IncQ характеризуется значительной автономностью, что обусловливает чрезвычайно широкий круг хозяев данных плазмид среди грамотрицательных бактерий.

Для плазмиды RSF1010 известна подробная рестрикционная карта и на ней локализованы промоторные районы (рис. 9.3). На первый взгляд, данную природную плазмиду можно без каких-либо реконструкций использовать в качестве клонирующего вектора. Для этих целей она имеет в области, несущественной для репликативных функций, участки узнавания четырех рестриктаз: *Eco*RI, *Sst*I, *Bst*EII и *Pst*I. Однако гены устойчивости к сульфаниламидам и стрептомицину входят в состав единого оперона и транскрибируются с одного промотора, поэтому при встройке *Pst*I-фрагментов будут инактивироваться оба селективных маркера — Su^r и Sm^r. При встройке по *Bst*EII-участку селективные маркеры, напротив, не повреждаются, что существенно усложняет отбор гибридных клонов. Клонирование по *Sst*I-участку приводит к инактивации гена устойчивости к стрептомицину *aph*C, но не нарушает ген *sul* (Su^r). Маркер Su^r также сохраняется при встройке по участку *Eco*RI. Сайт *Eco*RI расположен вне кодирующей последовательности гена устойчивости к стрептомицину, но введение чужеродных *Eco*RI-фрагментов обычно предотвращает его экспрессию, за исключением тех случаев, когда вставка содержит промотор, направляющий транскрипцию в сторону этого гена.

Таким образом, в качестве селективного маркера при встройке фрагментов ДНК в плазмиду RSF1010 может выступать лишь ген *sul*, однако многие виды бактерий относительно нечувствительны к сульфаниламидам, и поэтому данный генетический маркер имеет ограниченное применение при создании молекулярных векторов для широкого круга хозяев. Попытки преодолеть данное затруднение путем создания векторов на основе репликона RSF1010 и разных детерминант устойчивости к антибиотикам были предприняты в ряде лабораторий.

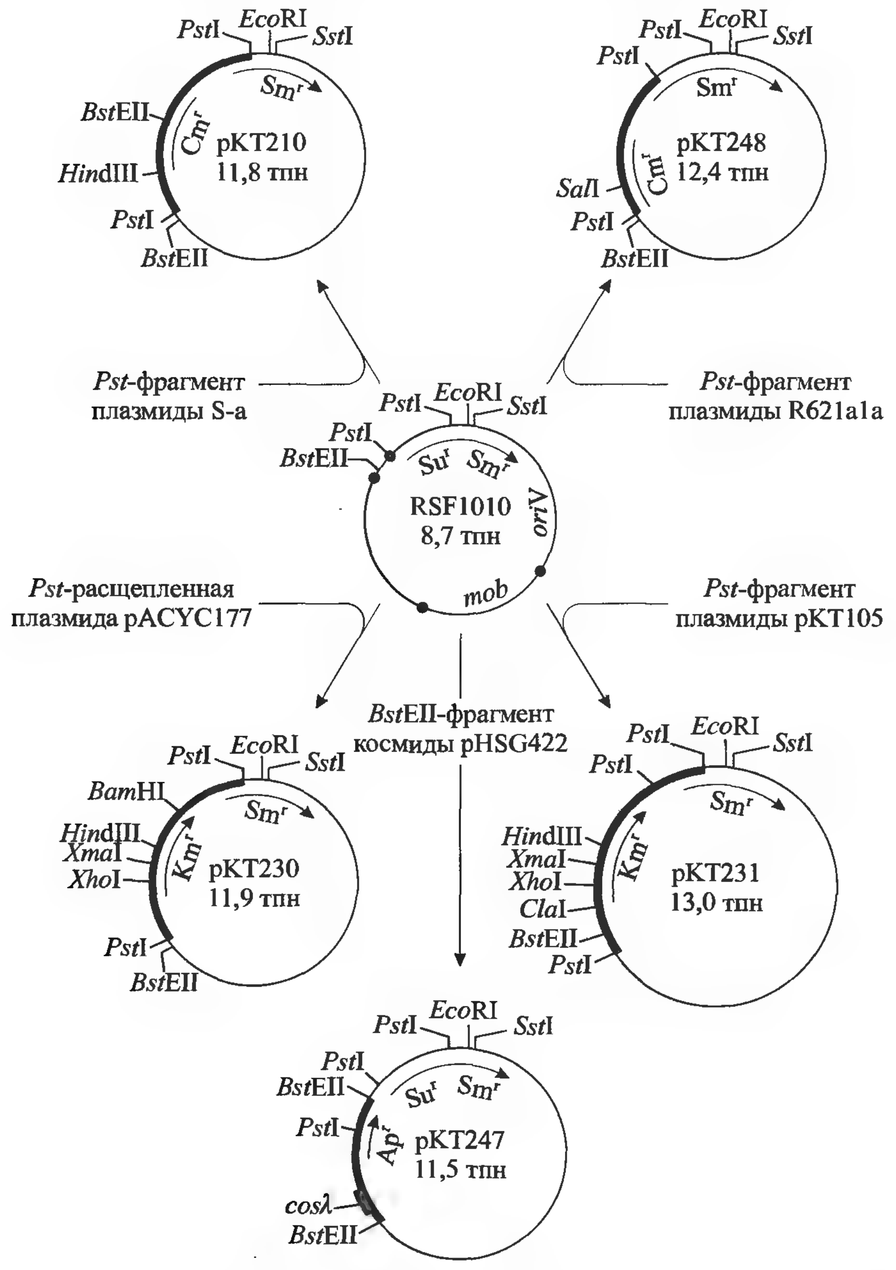


Рис. 9.3. Схема конструирования клонирующих векторов на основе плазмиды RSF1010.

Черными кружками обозначены места связывания с РНК-полимеразой *E. coli*, толстыми линиями — экзогенные фрагменты ДНК, встроенные в состав RSF1010

Одними из первых набор таких клонирующих векторов (см. рис. 9.3) получили М. Багдасарян с соавторами (1981 г.). Плазмида pKT210 содержит уникальные участки узнавания рестриктаз *Eco*RI, *Sst*I и *Hin*dIII. При этом *Hin*dIII находится вне генов антибиотикоустойчивости. Плазмида pKT248 кроме участков *Eco*RI и *Sst*I имеет сайт *Sal*I в гене *cat* (Cm^r).

Вектор pKT231 (Km^rSm^r) можно использовать для клонирования фрагментов ДНК по участкам *Hin*dIII, *Xma*I (*Sma*I), *Xho*I (Sm^rKm^s); *Eco*RI, *Sst*I (Km^rSm^r); *Cla*I и *Bst*EII (селективные маркеры не повреждаются). Плазмида pKT230 содержит почти такой же набор участков для встройки фрагментов, как и pKT231, за исключением сайта *Cla*I, и дополнительно имеет участок *Bam*HI вне генов устойчивости к антибиотикам.

Необходимо отметить, что ген устойчивости к стрептомицину в рассмотренных плазмидах транскрибируется с промоторов, локализованных во встроенных *Pst*I-фрагментах различного происхождения.

Встройкой *Bst*EII-фрагмента космиды *E. coli* pHSG422, содержащего ген *bla* (Ap^r) и участок *cos* фага λ, была получена космида широко-

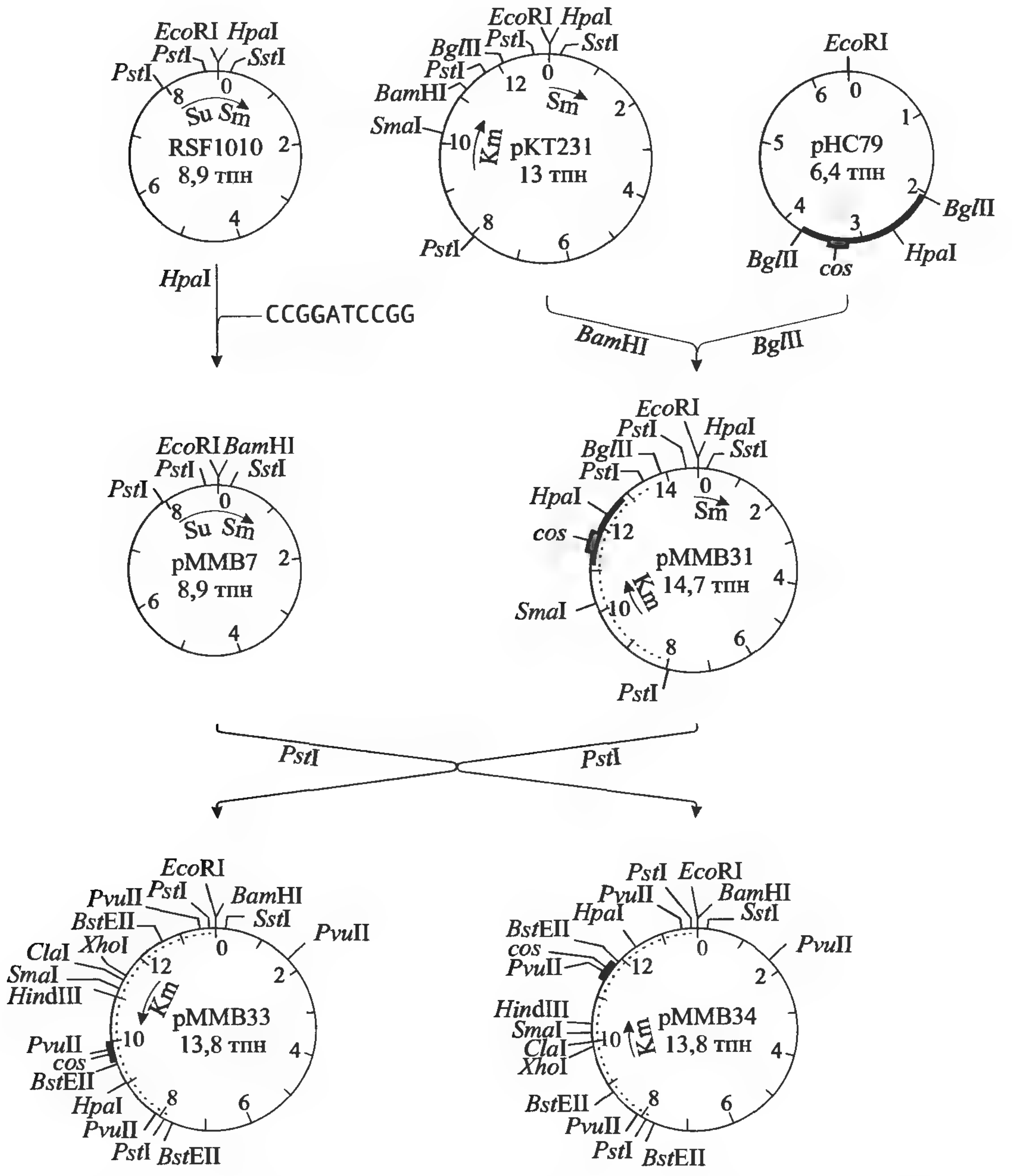


Рис. 9.4. Конструирование космидных векторов, имеющих широкий круг хозяев

го круга хозяев pKT247 (см. рис. 9.3). Данный вектор обеспечивает возможность встройки крупных фрагментов, генерированных рестриктазами *Eco*RI и *Sst*I, упаковки *in vitro* гибридных ДНК в частицы фага λ (см. 2.1.5) и введения их затем в клетки *E. coli*.

Создание космид с широким кругом хозяев имеет важное значение для развития генетического анализа грамотрицательных бактерий. При формировании представительных клонотек изучаемых геномов обычно используют рестриктазы *Sau*3AI или *Mbo*I (изошизомеры), которыми в условиях неполного гидролиза расщепляют ДНК на перекрывающиеся крупные фрагменты и встраивают их в космиды по участку *Bam*HI. С учетом этого в 1983 г. на основе репликона RSF1010 были созданы космиды pMMB33 и pMMB34 (рис. 9.4), содержащие в своем составе сайт гидролиза рестриктазой *Bam*HI. В дальнейшем Н. Кин с соавторами (1988 г.) получили космиду pLAFR-5 (рис. 9.5), которая несет два *cos*-участка и обеспечивает возможность высокоэффективного конструирования библиотек генов по методу Бейтса и Свифта (см. рис. 2.22) при гидролизе вектора рестриктазами *Bam*HI и *Sca*I (последняя формирует тупые концы).

Клонирующие плазмидные векторы на основе репликона RSF1010 с каждым годом со-

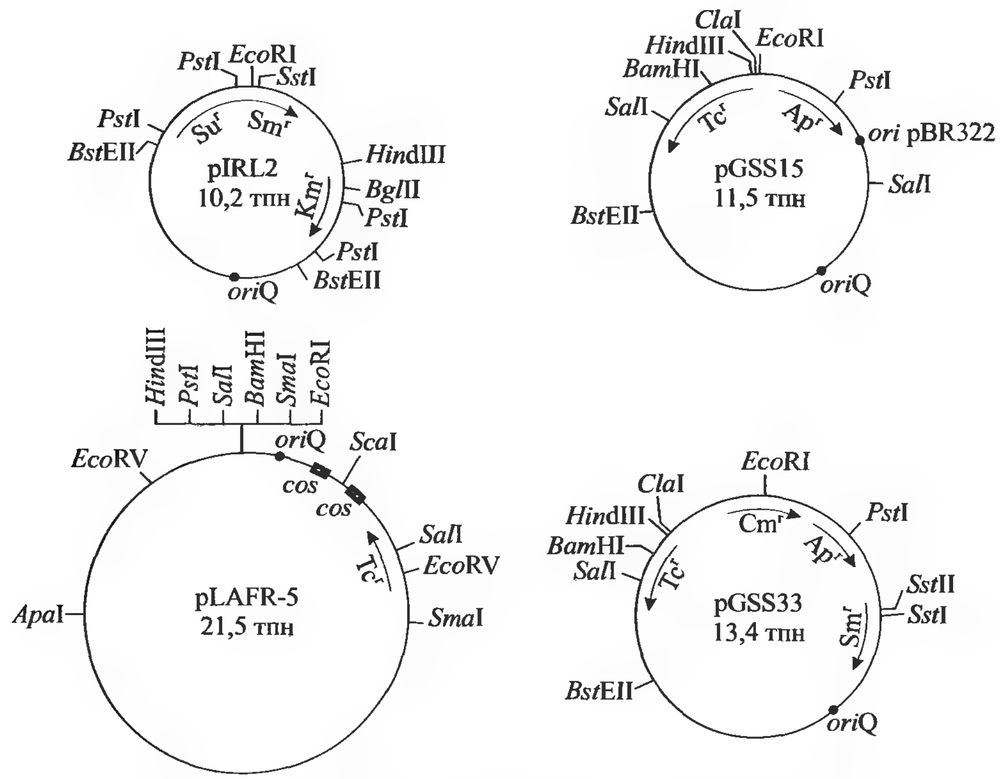


Рис. 9.5. Клонирующие векторы на основе плазмиды RSF1010.
oriQ — репликатор плазмиды RSF1010

вершенствуются. Некоторые из них представлены на рис. 9.5.

При конструировании гибридных ДНК *in vitro* содержание целевых молекул в смеси, полученной после лигазной реакции, невелико. Поэтому для введения этих молекул в бактерии и их амплификации необходима система с высокой эффективностью трансформации и отбора гибридов. Более всего для этого подходит *E. coli*. После выявления и подробного анализа целевых гибридных молекул ДНК, полученных на основе векторов широкого круга хозяев, их можно из клеток *E. coli* конъюгационно переносить (мобилизовать) практически в любой вид грамотрицательных бактерий и изучать экспрессию клонированных генов в новом генетическом (биохимическом) окружении. Для такого переноса плазмида-помощник (чаще всего группы IncP) должна находиться в той же клетке, в которую введена гибридная молекула ДНК на основе IncQ-репликона, содержащая необходимые для мобилизации генетические детерминанты *mob* и *ori*T.

В подавляющем большинстве работ используют именно конъюгационный перенос плазмидных (космидных) молекул ДНК в клетки грамотрицательных бактерий различных таксономических групп, а не трансформацию. Это обусловлено рядом причин. Во-первых, для многих видов бактерий эффективные методы трансформации пока не отработаны. Во-вторых, большое число используемых штаммов содержат системы рестрикции–модификации, которые значительно снижают эффективность трансформации двухцепочечными молекулами ДНК. В-третьих, для осуществления трансформации необходимо плазмиду (космиду) нарабатывать, выделять из клеток, очищать. Все перечисленные затруднения легко преодолеть, выполняя методически простую процедуру конъюгации бактерий. При этом внехромосомную ДНК не нужно выделять из клеток, а перенос мобилизуемых молекул происходит с высокой частотой (обычно не менее 10^{-1} на 1 донорную клетку), что позволяет надежно вводить их в гетерологичное окружение даже при наличии R–M-систем, так как в данном случае переносится одна цепь плазмидной ДНК.

Кроме разработки клонирующих векторов исследователи уделяют большое внимание созданию на основе плазмид группы IncQ экспрессирующих векторов, которые были бы способны не только реплицироваться, но и направлять транскрипцию встроенных последовательностей ДНК в различных грамотрицательных бактериях. М. Багдасарян с соавторами (1983 г.) создали первую векторную плазмиду pKT240 (рис. 9.6), предназначенную для клонирования

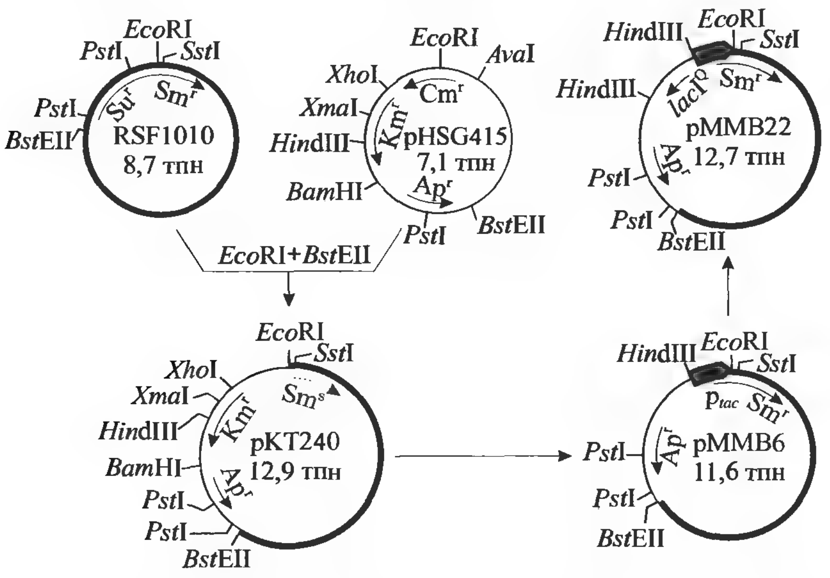


Рис. 9.6. Схема создания плазмиды pKT240 и плазмиды pMMB22 с регулируемым промотором

и фенотипического отбора промоторсодержащих фрагментов ДНК. При замене в RSF1010 *Bst*EII–*Eco*RI-фрагмента на фрагмент плазмиды pHSG415, содержащий гены устойчивости к ампициллину и канамицину, получена плазмида, у которой сохранена кодирующая последовательность гена *aph*C (Sm^r), но для ее экспрессии необходим промотор, направляющий транскрипцию этого участка плазмиды. Авторы встроили в pKT240 фрагмент *Hin*dIII–*Eco*RI (260 пн), содержащий промотор p_{tac} (см. рис. 3.2), и по фенотипу $Ap^rSm^rKm^s$ отобрали гибридную плазмиду pMMB6, которая детерминировала эффективную экспрессию гена *aph*C как в клетках *E. coli*, так и в *Pseudomonas putida*.

В 1981 г. С. Нагахари на примере гибридной плазмиды RSF1010-*trp* (несет гены триптофанового оперона *E. coli*) показал, что конститутивный сверхсинтез триптофансинтетазы *E. coli* в клетках *P. aeruginosa* приводит к высокой нестабильности гибридной плазмиды и быстрому снижению в клетках уровня активности данного фермента. Поэтому предпочтительнее при создании экспрессирующих векторов использовать регулируемые промоторы, которые можно эффективно репрессировать, а в нужный момент снимать эту репрессию (индуцировать транскрипцию).

Таблица 9.3. **Экспрессия гена катехол-2,3-диоксигеназы под контролем промотора p_{tac}**

Плазмида	Бактерия-хозяин	Ферментативная активность, е. а./(мг · мин)	
		без индукции	с индукцией ИПТГ[1]
pMMB25	*E. coli*	1,04	20,35
	P. putida	0,50	20,50
pMMB26	*E. coli*	21,71	22,01
	P. putida	23,00	22,10

[1] 2 мМ ИПТГ для *E. coli* и 5 мМ для *P. putida*.

В клетках *E. coli* функционирование промотора p_{tac} регулируется продуктом гена *lac*I (см. 3.2). Поэтому в состав плазмиды pMMB6 М. Багдасарян с соавторами встроили ген $lacI^Q$ (см. рис. 9.6). Оказалось, что этот ген экспрессируется не только в *E. coli*, но и в *P. putida* и эффективно репрессирует транскрипцию с промотора p_{tac}. При внесении в среду в качестве индуктора ИПТГ репрессия снимается и плазмидосодержащие клетки меняют фенотип с Sm^s на Sm^r. Данная система экспрессии также была проверена при встройке в векторы pMMB6 и pMMB22 по участку *Eco*RI фрагмента плазмиды биодеградации TOL, содержащего ген катехол-2,3-диоксигеназы. Полученные гибридные плазмиды соответственно обозначили pMMB26 и pMMB25. Анализ экспрессии гибридных конструкций показал (табл. 9.3), что вектор pMMB22 обеспечивает регулируемую транскрипцию встроенного гена как в клетках *E. coli*, так и в *P. putida*.

Для расширения возможностей полученного экспрессирующего вектора Н. Мермод с соавторами (1986 г.) в ходе ряда генно-инженерных манипуляций реконструировали его в вектор pMMB66EH (рис. 9.7). В этой плазмиде после промотора p_{tac} расположен полилинкер, позволяющий встраивать фрагменты ДНК, генерированные различными рестриктазами, а по-

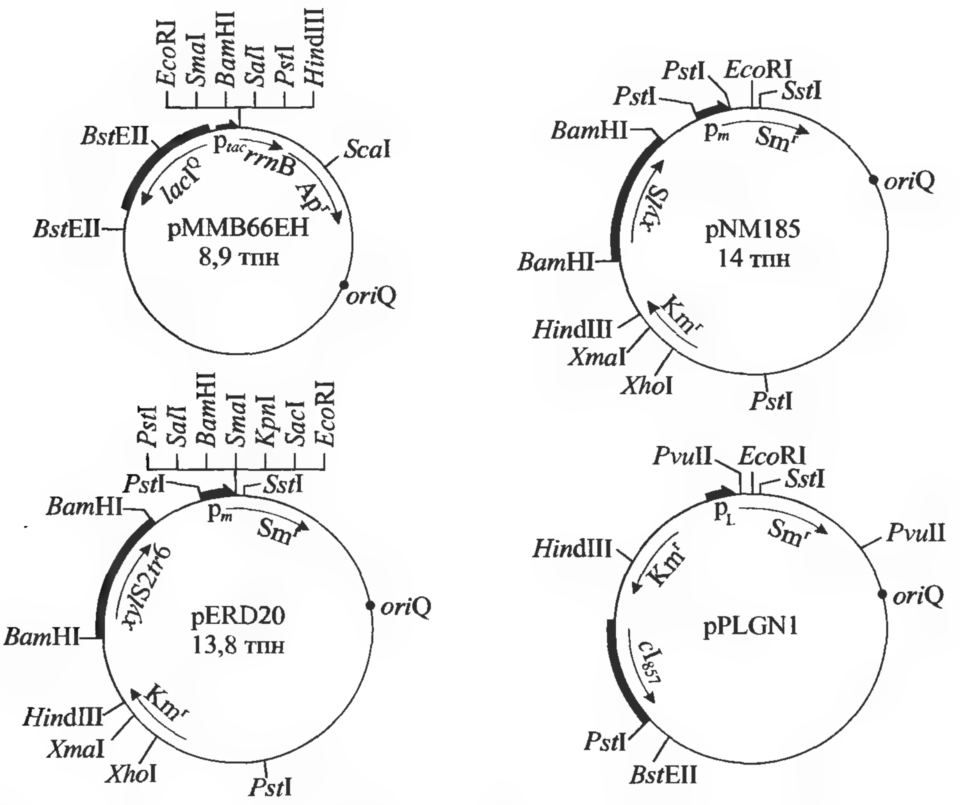


Рис. 9.7. Экспрессирующие векторы, предназначенные для широкого круга грамотрицательных бактерий

сле гена *rrn*B 5S рибосомной РНК находятся два терминатора транскрипции. Наличие терминаторов транскрипции должно стабилизировать поддержание гибридных молекул ДНК в бактериальных клетках при интенсивной транскрипции встроенных последовательностей с промотора. После встройки в pMMB66EH *Pst*I-фрагмента плазмиды RP4, несущего ген ДНК-праймазы, была получена гибридная плазмида pWP101, детерминирующая синтез этого фермента. Затем pWP101 перенесли в различные штаммы грамотрицательных бактерий путем мобилизации IncP-плазмидой. После индукции транскрипции с p_{tac} с помощью ИПТГ был выявлен эффективный синтез ДНК-праймазы в таких бактериях, как *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella aerogenes* и *Methylomonas clara*.

Дж. Санчез и Дж. Холмгрэн (1989 г.) использовали созданную векторную систему для экспрессии гена, кодирующего субъединицу В холерного токсина. Холерный токсин по организации очень похож на термолабильный энтеротоксин *E. coli* и состоит из одной субъединицы А, которая ответственна за активацию аденилатциклазы, приводящую к токсическому эффекту, и пяти идентичных субъединиц В (СТВ), которые обеспечивают связывание токсина с клетками-мишенями. Показано, что СТВ является эффективным иммуногеном, защищающим человека от холеры и диареи, вызываемой энтеропатогенными штаммами *E. coli*. Оральную вакцину получают инактивацией культуры холерных вибрионов, которая наряду с внеклеточными СТВ содержит целые клетки *Vibrio cholerae*. Успешное использование такой вакцины для профилактики указанных заболеваний и поставило на повестку дня вопрос о крупномасштабной наработке СТВ. На основе экспрессирующего вектора pMMB66EH (см. рис. 9.7) удалось создать штаммы *V. cholerae*, которые по продукции СТВ превосходят использовавшиеся ранее штаммы в 50–100 раз (при индукции транскрипции с p_{tac} на гибридной плазмиде).

Наряду с *tac*-промотором эффективно функционирует в широком круге хозяев и промотор p_{lacUV5}. Так, английские исследователи в 1982 г. продемонстрировали, что синтетический ген интерферона $\alpha 1$ человека, состыкованный с промотором p_{lacUV5}, эффективно экспрессируется в составе pGSS15 (см. рис. 9.5) в клетках *E. coli* и *Methylophilus methylotrophus*. Причем в метилотрофе, содержащем гибридную плазмиду, уровень синтеза интерферона примерно вдвое превосходит таковой в клетках *E. coli*. Способность метилотрофных бактерий расти на дешевых одноуглеродных субстратах в качестве

единственного источника углерода и энергии делает их перспективными для биотехнологического использования.

Уже первые генно-инженерные эксперименты показали, что один и тот же ген в грамотрицательных бактериях, относящихся к разным семействам, родам и даже к разным видам одного рода, может обусловливать значительно различающийся уровень синтеза кодируемого им белка. Причины этого чаще всего не ясны. Учитывая эти результаты, В. Г. Дебабов с сотрудниками предложили следующую схему исследований: целевой ген встраивается в экспрессирующий вектор с широким кругом хозяев и полученная гибридная плазмида затем конъюгационно переносится в большое число штаммов разных грамотрицательных бактерий. Созданные таким образом гибридные штаммы сравнивают по уровню продукции целевого белка и выбирают наилучший вариант.

Прекрасные результаты эти исследователи получили в 1984 г. при клонировании гена интерферона $\alpha 2$ человека в составе вектора на основе плазмиды RSF1010 под контролем промотора p_{lacUV5}. Сконструированную гибридную плазмиду путем мобилизации конъюгационно перенесли в десятки штаммов грамотрицательных бактерий, относящихся к родам *Methylomonas*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Rhizobium* и др. Наибольшая продукция интерферона была обнаружена в штамме *Pseudomonas* sp. Содержание интерферона в этой бактерии в 100 раз превосходило таковое в исходном штамме *E. coli* и достигало уровня 10^{10} е. а./л. Причины повышенной продукции интерферона в клетках *Pseudomonas* sp. не ясны. Возможно, в новом хозяине повышается стабильность белка и/или мРНК, сигналы инициации транскрипции и/или трансляции используются более эффективно. Гибридная плазмида, а следовательно, и клонированный ген могут иметь повышенную копийность. Скорее всего, в данном случае имело место изменение одновременно нескольких параметров экспрессии чужеродного гена. Созданный штамм *Pseudomonas* sp. был использован для разработки первой технологии микробиологического получения интерферона человека в России.

Муроока и Митани в 1985 г. продемонстрировали, что сильные промоторы фага λ способны направлять транскрипцию не только в клетках *E. coli*, но и в бактериях родов *Serratia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*. Дж. Мэттик с соавторами (1987 г.) использовали этот факт для решения важной практической задачи. Известно, что у ряда патогенных бактерий (*Bacteroides nodosus*, *Moraxella bovis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa* и др.) образуются на поверхности клеток фимбрии, которые по существующей классификации относятся к одному типу. Эти фимбрии играют важную роль как в патогенезе заболеваний, вызываемых данными бактериями, так и в формировании иммунного ответа организма. В частности, *Bacteroides nodosus*, грамотрицательный анаэроб, является одним из главных этиологических агентов, вызывающих заболевание под названием овечья копытная гниль. Данное заболевание наносит существенный урон животноводству, и поэтому ведется активный поиск путей его профилактики.

Наиболее эффективный подход — вакцинация животных препаратом фимбрий или целых клеток. Однако такие вакцины относительно дороги, так как культивировать *B. nodosus* достаточно сложно. Попытки создать продуценты фимбрий *B. nodosus* на основе клеток *E. coli* не дали ожидаемого результата, так как синтезируемые в *E. coli* структурные субъединицы не собираются в зрелые фимбрии, а локализуются в клеточной мембране. Полноценный же иммунный ответ можно получить лишь при вакцинации препаратом фимбрий. Поэтому возникла идея использовать в качестве продуцентов бактерии, способные формировать аналогичные фимбрии. Для этой цели выбрали *Pseudomonas aeruginosa*. В клонирующий вектор pKT240 встроили ген субъединицы фимбрий, состыкованный с сильным промотором p_L фага λ. В полученном штамме *P. aeruginosa* в большом количестве синтезировалась субъединица фимбрий и, более того, на поверхности клеток формировались зрелые фимбрии, не отличимые от фимбрий *B. nodosus*. Созданный штамм позволил значительно упростить получение вакцинного препарата против копытной гнили животных. Кроме того, поскольку для сборки фимбрий важное значение имеет лишь N-концевая последовательность структурной субъединицы, а С-концевая может существенно варьировать, имеется возможность, вводя в одну клетку гены структурных субъединиц фимбрий разных серотипов (отличающихся по С-концевой последовательности), получать при их одновременной экспрессии смешанные фимбрии, которые явятся поливалентными вакцинами нового типа.

Р. Лиманс с соавторами (1987 г.) создали более совершенную систему экспрессии чужеродных генов с использованием промотора фага λ. В клонирующий вектор pKT240 наряду с фаговым промотором они ввели ген термо-

чувствительного репрессора cI_{857}. В сконструированном векторе pPLGN1 (см. рис. 9.7) *Pvu*II-фрагмент, находящийся в районе гена устойчивости к стрептомицину, заменили на кодирующую последовательность зрелой формы интерлейкина 2 человека, состыкованную с участком связывания рибосом гена *ner* фага Mu. Созданную гибридную плазмиду pPLGN1HIL2 из клеток *E. coli* конъюгационно перенесли (мобилизовали) в бактерии родов *Erwinia* и *Serratia*. Анализ экспрессии гена IL-2 показал (табл. 9.4), что промотор p_L фага λ функционирует во всех этих бактериях и его активность регулируется фаговым репрессором cI, как и в клетках *E. coli* — естественном хозяине фага λ.

Возможности другой хорошо изученной для *E. coli* векторной системы, обеспечивающей регулируемую транскрипцию клонированных генов, — системы на основе промотора и РНК-полимеразы фага T7 (см. 3.2) — использовал для создания векторов широкого круга хозяев Н. Пагратис (1987 г.). Плазмида pKT230 (IncQ) была объединена с генетической конструкцией, состоящей из гена *lac*I дикого типа (кодирует репрессор *lac*-оперона) и гена *1* фага T7 (кодирует фаговую РНК-полимеразу), помещенного под контроль промотора p_{lacUV5}. Гибридная плазмида pNP148 (рис. 9.8) сохранила функции репликации и мобилизации исходной плазмиды. На основе IncP-репликона создан экспрессирующий вектор pNP109, который несет поздний промотор фага T7, подстроенный к полилинкерной области из плазмиды pUC18. Для проверки функционирования этой двухплазмидной системы в pNP109 по *Bam*HI-участку встроили фрагмент ДНК, содержащий ген β-галактозидазы *E. coli*. Гибридную плазмиду трансформацией ввели в клетки *E. coli*[pNP148] и *Pseudomonas phaseolicola*[pNP148]. В обоих штаммах после добавления в питательную среду ИПТГ наблюдалась эффективная индукция синтеза β-галактозидазы. Учитывая, что регулируемая система экспрессии с промотора p_{lac} функционирует в широком круге грамотрицательных бактерий, можно рассчитывать на использование генетических элементов фага T7 для высокоэффективной регулируемой транскрипции чужеродных генов в разных грамотрицательных бактериях.

Таблица 9.4. **Синтез интерлейкина 2 человека, направляемый плазмидой pPLGN1HIL2, в грамотрицательных бактериях**

Бактерия-хозяин	Температура культивирования, °С	Активность IL-2, е. а./мл
Escherichia	28	< 1
coli MC1061	42	4200
Erwinia	28	< 1
chrysanthemi	42	600
Erwinia	28	< 1
carotovora	42	525
Serratia	28	< 1
marcescens	42	780

Технологически перспективную векторную систему регулируемой экспрессии клонированных генов разработали К. Тиммис с сотрудниками (1986–1988 гг.). На основе клонирующего вектора pKT231 (см. рис. 9.3) была сконструирована плазмида pNM185 (см. рис. 9.7), в которой ген устойчивости к стрептомицину находится под контролем двойного промотора p_m TOL-плазмиды pWWO. Промотор p_m направляет транскрипцию оперона, детерминирующего путь мета-расщепления ароматических

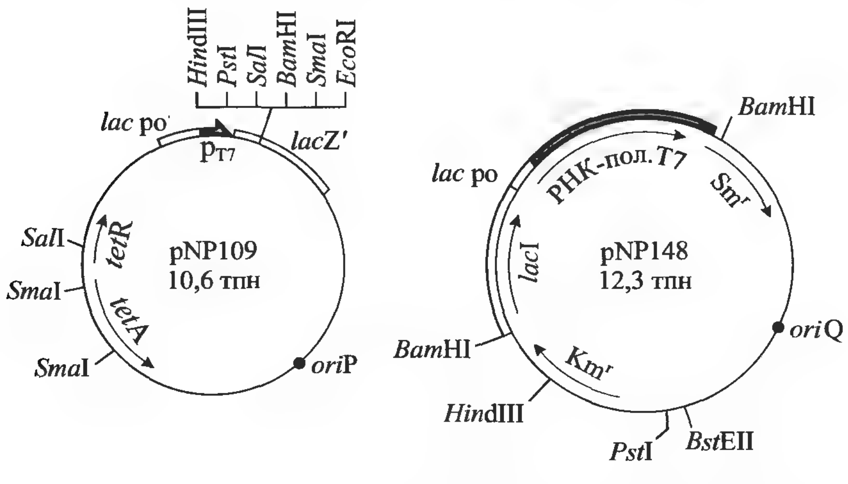


Рис. 9.8. Спаренная векторная система на основе промотора и РНК-полимеразы фага T7

Таблица 9.5. **Синтез катехол-2,3-диоксигеназы в бактериях, несущих плазмиду pNM187**

Бактерия	Активность фермента, нмоль/мин		Отношение активностей
	без индукции	с индукцией 5 мМ мета-толуата	
Группа I			
Pseudomonas aeruginosa	250	6000	24
Aeromonas hydrophila	19	1900	100
Pseudomonas putida	35	610	17
Aerobacter aerogenes	12	590	49
Serratia marcescens	5,6	460	82
Erwinia carotovora	—*	420	> 420
Escherichia coli	—	410	> 410
Klebsiella pneumoniae	—	270	> 270
Acinetobacter calcoaceticus	—	58	> 58
Proteus mirabilis		—	—
Группа II			
Pseudomonas testosteroni	120	460	4
Alcaligenes eutropus	1,6	7,6	5
Группа III			
Paracoccus denitrificans	—	140	> 140
Agrobacterium tumefaciens	26	44	2
Rhizobium meliloti	6,6	9,0	1
Неклассифицированные бактерии			
Xanthomonas campestris	26	190	7
Hyphomicrobium sp.	—	86	> 86
Moraxella nonliquefaciens	—	32	> 32

Примечание. Бактерии сгруппированы по признаку гомологии 5S РНК.
* Активность не выявляется.

органических кислот, причем позитивным регулятором этого промотора является белковый продукт гена *xylS*. Поэтому в pNM185 введен и ген *xylS*. Активация белка XylS микроколичествами бензоата или мета-толуата приводит к индукции транскрипции с p_m. Для изучения возможностей созданной системы экспрессии в pNM185 по *Eco*RI-участку встроили фрагмент TOL-плазмиды pWW2, содержащий кодирующую последовательность гена катехол-2,3-диоксигеназы (*xylE*). Полученную таким образом гибридную плазмиду pNM187 конъюгационно переносили в разные виды грамотрицательных бактерий и анализировали экспрессию целевого гена в условиях активации белка XylS и в отсутствие активации (табл. 9.5). Результаты выполненных экспериментов продемонстрировали широкие возможности данной системы экспрессии чужеродных генов в разных видах бактерий. Важной для технологического использования особенностью этой системы является то, что экспрессия клонируемого гена активируется добавлением малых количеств очень дешевых химических соединений. Это выгодно отличает ее от других генно-инженерных систем с регулируемой экспрессией целевых генов.

При изучении функционирования плазмиды pNM185 были выделены ее производные, которые направляли синтез мутантных белков XylS, обладающих измененной специфичностью по отношению к эффекторным молекулам. Так, белок XylS2 не только активировался 3-метилсалицилатом, которым не активируется белок XylS, но при этом обусловливал и более высокий уровень транскрипции с промотора p_m. Кроме того, обнаружено, что при повышении температуры уровень транскрипции с промотора p_m и активация его белком XylS снижаются. Целенаправленный поиск позволил выделить мутант *xylS2tr6* (плазмида pERD2*tr6*), который направлял транскрипцию с p_m и при повышенной температуре. Поместив после промотора полилинкер, получили экспрессирующий вектор pERD20 (см. рис. 9.7), обеспечивающий возможность встройки различных фрагментов и их эффективную регулируемую экспрессию даже в термофильных бактериях.

9.3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ ПЛАЗМИД ГРУППЫ НЕСОВМЕСТИМОСТИ IncP

Некоторые группы грамотрицательных бактерий осуществляют такие уникальные процессы, как фиксация молекулярного азота, окисление одноуглеродных органических соединений, утилизация ароматических соединений и др. Как правило, в клетке за каждый такой метаболический путь отвечает набор ферментов, функционирование которых регулируется экспрессией специальных оперонов, локализующихся или на бактериальной хромосоме, или на плазмиде. Внесение этих оперонов (или их отдельных генов) в составе многокопийных клонирующих векторов в бактерии других таксономических групп может приводить к суперсинтезу соответствующих ферментов и гибели клеток из-за нарушения их метаболического баланса (токсический эффект). Преодолеть подобное затруднение можно, используя низкокопийные векторы. Наибольшие успехи в создании векторной системы такого типа с широким кругом хозяев достигнуты при манипуляциях с плазмидой RK2. Она относится к группе IncP, является конъюгативной, имеет размер 60 тпн, стабильно поддерживается в широком спектре грамотрицательных бактерий при низкой копийности.

Большой вклад в развитие данной генно-инженерной системы внесли сотрудники лаборатории Д. Хелинского (1979–1985 гг.). Они получили плазмиду pRK290 (рис. 9.9), послужившую основой для создания других многочисленных молекулярных векторов. Уже первые эксперименты показали, что pRK290 совместима с плазмидой pRK2013. Последняя также является производной RK2, но у нее с помощью рестриктаз делетирован большой фрагмент ДНК, включающий собственный репликон, и заменен на репликон плазмиды ColE1. При этом в pRK2013 сохранились все функции конъюгационного переноса. Оказалось, что pRK2013 способна эффективно мобилизовать плазмиду pRK290 и ее производные из клеток *E. coli* в широкий круг грамотрицательных бактерий. Недостатком данной векторной системы является то, что плазмиды pRK290 и pRK2013 имеют районы гомологии и поэтому стабильно сосуществовать они могут лишь в клетках *E. coli*, дефектных по системе рекомбинации.

Плазмида pRK290 содержит уникальные участки гидролиза рестриктазами *Eco*RI и *Bgl*II, по которым можно клонировать экзогенные фрагменты ДНК. Встройкой синтетических линкеров участок *Bgl*II был заменен на сайт *Bam*HI (плазмида pRK291) или *Hin*dIII (pRK292). Недостатком этих трех векторов является отсутствие возможности простого фенотипического отбора гибридных клонов: они могут быть выявлены лишь после гибридизации нуклеиновых кислот или радиоиммуноанализа *in situ* либо при комплементации определенных мутаций клетки-хозяина. Поэтому усилия исследователей были направлены на создание более удобных молекулярных векторов. Рассмотрим некоторые из них (рис. 9.10).

Плазмида pRK293 (Km^rTc^r) содержит *Hae*II-фрагмент (1430 пн), несущий ген устойчивости к канамицину из состава транспозона Tn*903*. Данная плазмида обеспечивает фенотипический отбор гибридов при инактивации генетического маркера Km^r (встройка по *Hind*III- или *Xho*I-участкам) или Tc^r (встройка по сайту *Sal*I).

pRK310 является производной pRK290, несущей *Hae*II-фрагмент (424 пн) плазмиды pUC9 (см. рис. 2.35), содержащий кодирующую последовательность α-пептида β-галактозидазы и полилинкерную область. Гибридные плазмиды выявляются после трансформации клеток *E. coli*, синтезирующих дефектную β-галактозидазу (α-акцептор), по окраске колоний, выросших на агаризованной среде с тетрациклином, ИПТГ и Xgal (подробнее о данной системе отбора см. 2.2.6).

Вектор pRK311 представляет собой космиду с широким кругом хозяев, полученную после встройки в pRK310 *Bgl*II-фрагмента (1,6 тпн) из состава космиды *E. coli* pHC79, содержащего *cos*-сайт фага λ.

Р. Фейни с соавторами (1988 г.) на основе pRK290 создали плазмиду pAF300, предназначенную для селекции фрагментов ДНК, которые способны выполнять функции промоторов. Для этого в состав pRK290 по *Bgl*II-участку встроили *Bam*HI-фрагмент ДНК (1,5 тпн), содержащий ген *cat* хлорамфениколацетилтрансферазы, лишенный своего промотора. При встройке в pAF300 по участкам *Hin*dIII или *Pst*I промоторсодержащих фрагментов ДНК, направляющих транскрипцию в сторону гена *cat*, фенотип, детерминируемый плазмидой, изменяется с Tc^rCm^s на Tc^rCm^r.

Используя сконструированный вектор, можно клонировать самые различные промоторы и проводить сравнительное изучение их функционирования в широком спектре грамотрицательных бактерий. Так, в лаборатории

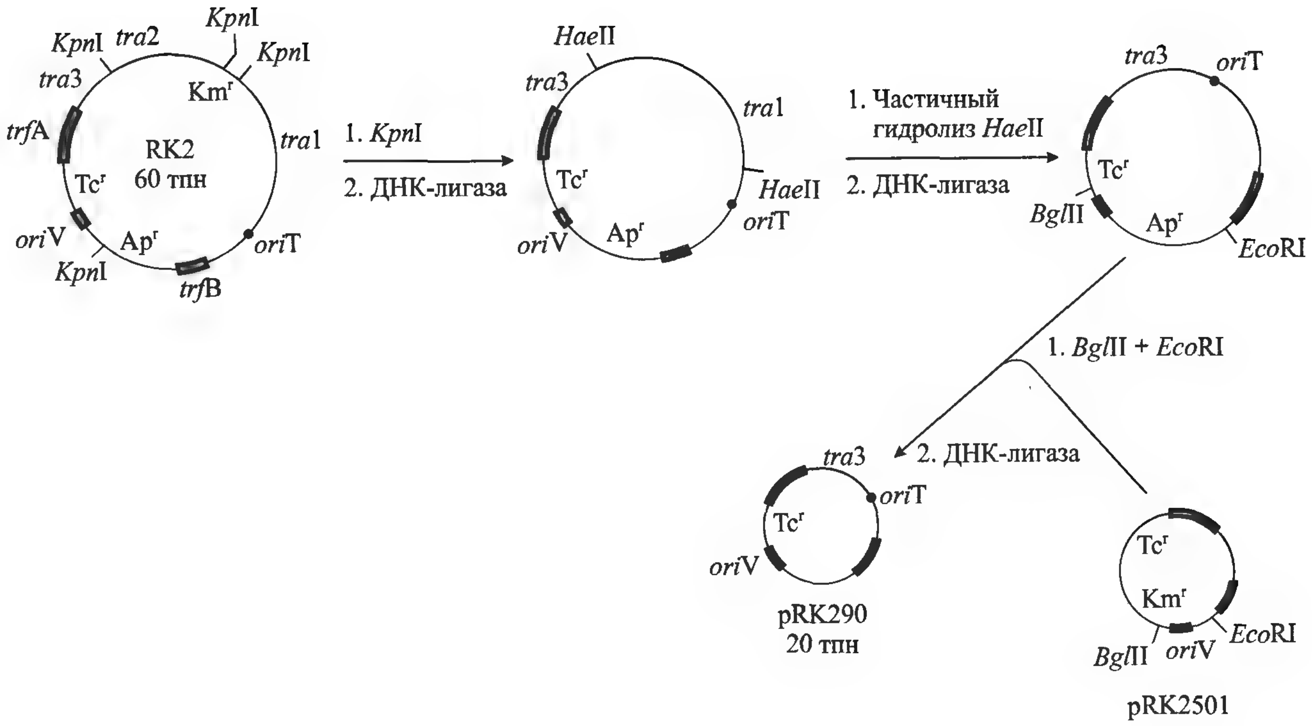


Рис. 9.9. Схема создания плазмиды pRK290.

*Hae*II имеет на плазмидной ДНК много участков узнавания, и обозначены лишь те, которые были реально использованы при получении pRK290

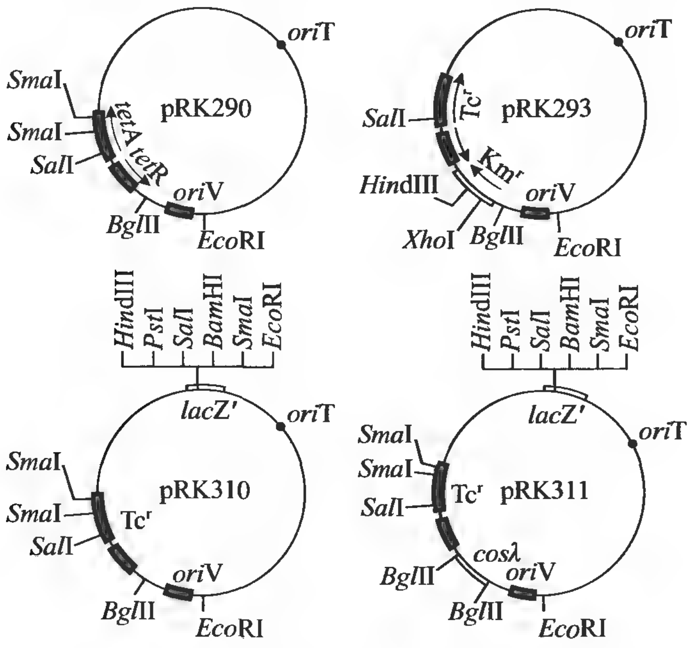


Рис. 9.10. Клонирующие векторы на основе плазмиды RK2

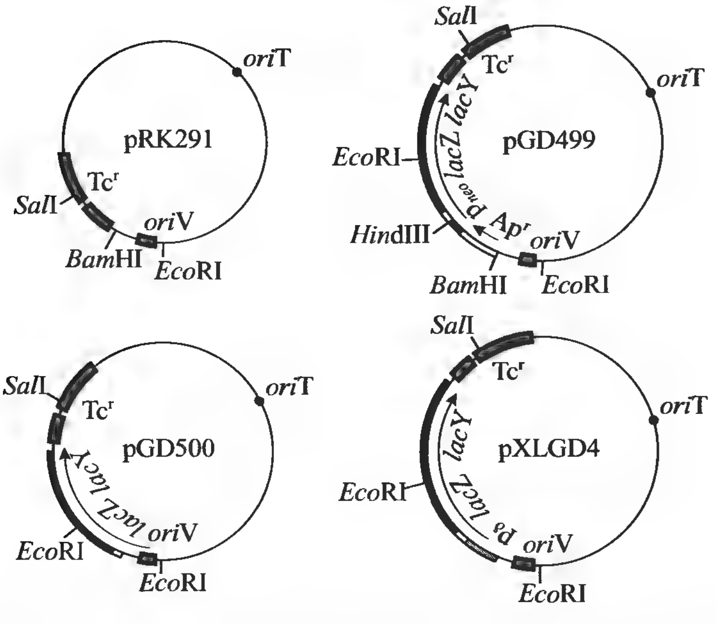


Рис. 9.11. Векторная плазмида pRK291 и ее гибридные производные

Д. Хелинского на основе плазмиды pRK291 получены гибридные варианты pGD499, pGD500 и pXLGD4 (рис. 9.11), в которых структурная часть гена *lac*Z находится соответственно под контролем промотора гена устойчивости к канамицину, промотора района *ori*V плазмиды RK2 или промотора гена δ-аминолевулинатсинтетазы *Rhizobium meliloti*. Анализ продукции β-галактозидазы показал, что активность данных промоторов значительно варьирует в разных хозяевах (табл. 9.6). Поэтому большой интерес представляет вопрос о том, как структура промотора влияет на его функционирование в той или иной бактерии. Клонирование и секвенирование, а также оценка «силы» достаточно большого числа промоторов в бактериях разных таксономических групп позволит сделать обоснованное заключение об особенностях процесса инициации транскрипции у изучаемых бактерий. Кроме того, такие исследования помогут выявить промоторы, наиболее пригодные для решения целевых задач по экспрессии определенных кодирующих последовательностей в выбранных грамотрицательных бактериях.

Таблица 9.6. **Относительная активность β-галактозидазы, детерминируемой гибридными плазмидными генами в некоторых грамотрицательных бактериях**

Бактерия-хозяин	Плазмида			
	pRK290	pGD499	pGD500	pXLGD4
Escherichia coli	3	1042	6	6
Rhizobium meliloti	1	208	141	622
Pseudomonas putida	2	80	76	149
Rodopseudomonas sphaeroides	2	9	2	422
Acinetobacter calcoaceticus	4	114	8	12
Caulobacter crecentus	2	393	296	4832

Примечание. Для каждого вида бактерий приведено среднее значение активности β-галактозидазы, определенной в двух независимо полученных трансконъюгатах.

9.4. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЕКТОРОВ ШИРОКОГО КРУГА ХОЗЯЕВ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Благодаря созданию клонирующих векторов, способных реплицироваться и стабильно поддерживаться в разных грамотрицательных бактериях, появилась возможность получать библиотеки генов изучаемых бактерий, проводить молекулярно-генетические исследования организации и функционирования хромосомных и плазмидных генов, а также координируемо регулируемых наборов генов (оперонов). С помощью комплементационного анализа удается выявлять гибридные молекулы ДНК, несущие определенные локусы бактериальной хромосомы. При этом комплементация функций возможна и в неродственных, но относительно хорошо изученных бактериях. Рассмотрим некоторые исследования такого типа.

В составе плазмиды pKT240 Д. Джинес с соавторами (1986 г.) клонировали фрагменты ДНК *Pseudomonas aeruginosa*, содержащие гены *arg*A, *arg*F или *pro*C. В этом же векторе клонировали фрагменты ДНК *E. coli* с изофункциональными генами, а также с геном *pro*B. Экспрессия генов *Pseudomonas* в клетках *E. coli* составляла 0,3–5,0 % от уровня, наблюдаемого в *P. aeruginosa*. Если ген *pro*C *P. aeruginosa* помещали под контроль *tac*-промотора, продукция в *E. coli* фермента, кодируемого данным геном, значительно повышалась. Этот результат указывает на то, что по крайней мере в ряде случаев препятствием для эффективного выражения генов *Pseudomonas* в клетках *E. coli* является низкий уровень инициации их транскрипции. В то же время многие гены *E. coli*, клонированные в составе векторов широкого круга хозяев, эффективно функционируют в клетках *Pseudomonas*. Так, экспрессия генов *pro*B и *pro*C *E. coli* в клетках *P. aeruginosa* составляет около 50 % от таковой в клетках *E. coli*. Это подтверждает распространенное мнение о том, что *P. aeruginosa* является более удобной системой для экспрессии генов грамотрицательных бактерий, чем *E. coli*. В клетках псевдомонад могут эффективно экспрессироваться и гены грамположительных бактерий. Французские исследователи показали, что α-амилаза *Bacillus licheniformis* эффективно продуцируется в клетках *P. aeruginosa*, содержащих клонированный в векторе pKT230 ген *B. licheniformis*. При этом 85 % синтезируемого фермента секретировалось в периплазму, но не выходило из клеток.

С помощью клонирующих векторов широкого круга хозяев подробно изучена генетическая организация и функционирование оперонов биодеградации таких плазмид, как NAH, TOL и др. К. Яджи с соавторами (1986 г.) в составе космиды субклонировали *hox*-оперон из гигантской (около 400 тпн) плазмиды pHG21-a грамотрицательной факультативной водородной бактерии *Alcaligenes hydrogenophilus*. После введения в клетки *P. oxalaticus* этот оперон обеспечивал им возможность водород-зависимого автотрофного роста.

Интересные исследования провели Дж. Плазинский и Е. Рольф (1985 г.). Способность фиксировать атмосферный азот при симбиозе между бобовыми растениями и почвенными бактериями ограничивается лишь представителями рода *Rhizobium*. Генетическая основа такого ограничения пока не очень понятна. Но известно, что ряд этапов образования корневых клубень-

ков у бобовых и фиксации азота контролируется плазмидами *Rhizobium*, названными Sym (symbiosis). Клонируя фрагменты ДНК плазмиды Sym и вводя их в составе гибридных плазмид в различные бактерии, можно изучать организацию генов, контролирующих процессы симбиоза и фиксации атмосферного азота. Так, коинтегрант плазмиды Sym с вектором широкого спектра хозяев конъюгационно перенесли в бактерии *Lignobacter* и *P. aeruginosa*. В результате бактерии *Lignobacter* приобрели способность формировать на корневых волосках растений клубеньки, но азот не фиксировали. Клетки псевдомонад в тех же условиях проявляли заметно меньшую способность к формированию клубеньков.

Последующие целенаправленные исследования дадут возможность понять молекулярную природу симбиотического взаимодействия клубеньковых бактерий и растений-хозяев, а также механизма фиксации атмосферного азота, которая инициируется на определенной стадии симбиоза бактерии с растением. Познание этих процессов на уровне регуляции функционирования определенных генов и их комбинаций позволит направленно создавать бактерии, обеспечивающие эффективное образование клубеньков и фиксацию азота. Такие штаммы имеют большое значение для земледелия.

Рассмотренные примеры со всей очевидностью демонстрируют огромные перспективы использования векторной системы, предназначенной для клонирования и экспрессии чужеродных генов в широком спектре грамотрицательных бактерий. Важно отметить, что при создании векторов данного типа активно используются опыт и знания, накопленные в ходе разработки генно-инженерной системы *E. coli*.

9.5. БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ (ЧЕЛНОЧНЫЕ) ВЕКТОРНЫЕ ПЛАЗМИДЫ

Как уже упоминалось, плазмиды с широким кругом хозяев, относящиеся к группам несовместимости *E. coli* IncP и IncQ, в эубактериях рода *Bacteroides* не реплицируются. Плазмиды, выделенные из клеток *Bacteroides*, также не реплицируются в *E. coli*. Более того, не найдено генетических маркеров устойчивости к антибиотикам, которые бы экспрессировались и в клетках *E. coli*, и в *B. fragilis*. Поэтому возникла необходимость создания специальной векторной системы для этих бактерий.

Самый простой подход состоит в конструировании гибридной кольцевой молекулы ДНК, содержащей два репликона, один из которых функционирует в *E. coli*, а другой в *B. fragilis*. Плазмида также должна нести генетические маркеры, экспрессируемые в том или ином хозяине. Такие бифункциональные (бирепликонные) плазмиды иначе называют челночными. Однако, если челночную плазмиду формируют объединением слабо изученных плазмид (у которых не локализованы гены, необходимые для репликации), она может иметь относительно большие размеры и содержать ограниченное число участков узнавания рестриктаз, удобных для клонирования чужеродных фрагментов ДНК. В этом случае требуются дополнительные исследования, позволяющие уменьшить размер бирепликонной плазмиды и ввести в нее уникальные рестриктазные сайты.

Первый молекулярный вектор, способный реплицироваться в клетках *E. coli* и *B. fragilis*, — челночную плазмиду pDP1 — сконструировали Д. Гиней с соавторами (1984 г.). Плазмида имела относительно большие размеры (19 тпн) и была плохо приспособлена для клонирования фрагментов ДНК и отбора гибридных клонов. В ее состав входили: фрагмент плазмиды pD65, содержащий *ori*V плазмиды pBR322, ген *bla* (Ap^r) и *ori*T плазмиды RK2, а также полная копия плазмиды pCP1 *Bacteroides*, которая детерминирует устойчивость к клиндамицину или эритромицину (Cl^r, Em^r). Необходимо отметить, что *B. fragilis* чрезвычайно чувствительна к клиндамицину (минимальная ингибирующая рост концентрация составляет 0,5 мкг/мл), а изученные R-факторы *Bacteroides* обеспечивают устойчивость именно к этому антибиотику. Челночная плазмида pDP1 в *E. coli* реплицировалась за счет *ori*V pBR322 и детерминировала устойчивость к ампициллину, а в *B. fragilis* ее репликация направлялась репликоном pCP1, и плазмида обусловливала фенотип Cl^r. Наличие в составе pDP1 участка *ori*T плазмиды RK2 обеспечивало эффективный конъюгационный перенос ее из *E. coli* в *B. fragilis* с помощью плазмид группы IncP.

В результате генно-инженерных манипуляций в 1988 г. на основе pDP1 были созданы серия плазмид и космида меньшего размера. Они обладают всеми описанными выше свойствами, но более удобны для получения и анализа гибридных молекул ДНК.

При создании челночных векторов для системы *E. coli* – *B. fragilis* удачную схему реализовал К. Смит (1985 г.), объединив *in vitro* плаз-

миды pUC19 (реплицируется в *E. coli*, содержит полилинкер для большого числа рестриктаз, см. рис. 2.35, 6.12), pBI143 (криптическая мелкая (2,7 тпн) многокопийная плазмида *Bacteroides*), а также фрагмент R-фактора, несущий ген *erm* (Cl^r). Полученная бифункциональная плазмида размером 7,3 тпн оказалась удобной для клонирования за счет наличия полилинкера и системы прямой селекции гибридных ДНК в *E. coli* (α-комплементация β-галактозидазы; см. 2.2.6). Отобранные в *E. coli* и охарактеризованные гибридные плазмиды можно трансформировать в клетки *Bacteroides*.

Созданная совокупность клонирующих челночных векторов позволяет проводить подробный генетический анализ *Bacteroides* — бактерии, которая эволюционно значительно отдалена от энтеробактерий, в частности *E. coli*.

Другим важным объектом исследования являются цианобактерии. Они уникальны среди фотосинтезирующих прокариот своей способностью к оксигенному фотосинтезу, очень схожему с таковым у высших растений.

Благодаря тому что бактерии имеют одну хромосому (гаплоидный набор генов), можно достаточно легко получать и характеризовать мутанты по интересующим генам. Так, в последние годы получены многочисленные мутанты цианобактерий по генам, контролирующим различные этапы фотосинтеза. Поэтому цианобактерии представляют собой прекрасные объекты для клонирования и изучения функций генов фотосинтетической системы.

Наиболее активно в данном плане развиваются исследования одноклеточной цианобактерии *Anacystis nidulans*. Показано, что многие штаммы содержат плазмиды, но они являются криптическими и не могут напрямую использоваться в качестве молекулярных векторов. Попытки трансформировать *A. nidulans* плазмидами pBR322, pACYC184 или RP4 не увенчались успехом. Однако в 1980 г. К. Ван ден Хонделу с соавторами удалось перенести в криптическую плазмиду pUH24 транспозон Tn*901* (Ap^r) из плазмиды *E. coli* pRI46. В результате была сконструирована плазмида pCH1, из которой после делетирования фрагмента ДНК, содержащего один из концевых инвертированных повторов транспозона, получили плазмиду pUC1. Такой делеционный вариант уже стабильно сохранял детерминанту Ap^r. Оказалось, что штамм *A. nidulans* R2 можно трансформировать плазмидой pUC1 или pCH1. При этом ни pUC1, ни pCH1 не могли трансформировать компетентные клетки *E. coli*, что указывает на различие репликативных систем *E. coli* и *A. nidulans*.

Время генерации (*g*) у цианобактерий рода *Anacystis* составляет обычно 12–18 ч, поэтому эксперименты на них значительно длительнее, чем на *E. coli* (*g* около 30 мин). Для упрощения генно-инженерных манипуляций в ряде лабораторий были созданы челночные плазмидные векторы, способные реплицироваться и детерминировать устойчивость к антибиотикам как в *E. coli*, так и в *A. nidulans* (рис. 9.12). Получение гибридных плазмид и их первичную характеризацию проводят в системе *E. coli*, а затем они могут быть перенесены в клетки *Anacystis* и подвергнуты более подробному исследованию. Перенос бифункциональных плазмид можно осуществлять либо в процессе трансформации клеток, либо конъюгационно, используя в качестве помощника плазмиды группы IncP. В последнем случае фрагмент плазмиды *E. coli*, входящий в состав челночного вектора, должен содержать генетические элементы, необходимые для мобилизации плазмиды.

Анализ *in vitro* показал, что РНК-полимераза цианобактерий узнает промоторы фага λ. Поэтому Д. Фридберг и Дж. Сейджферс (1986 г.) сконструировали челночные плазмиды с регулируемой транскрипцией целевого гена в клетках *E. coli* и *A. nidulans*. Одна из таких плазмид — pPL1940 (см. рис. 9.12) состоит из репликона криптической плазмиды pDF3 (аналог pUH24) цианобактерии, ColE1-репликона, генов устойчивости к антибиотикам (Ap^r, Km^r) и блока регулируемой транскрипции, который представляет собой ген *c*I_{857} термочувствительного репрессора фага λ и промоторно-операторную область p_Lo_L (см. 2.2.2). По *Bam*HI-участку в pPL1940 встроили кодирующую последовательность гена *cat* хлорамфениколацетилтрансферазы и изучили экспрессию гена в составе гибридной плазмиды в клетках *E. coli* или *A. nidulans*. При температуре 34 °С экспрессия гена *cat* в *E. coli* практически отсутствовала, а в цианобактерии была очень незначительной. После повышения температуры до 39 или 42 °С происходила инактивация белка cI и индуцировался конститутивный синтез хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT) с промотора p_L. Однако если в клетках *E. coli* фермент начинал синтезироваться почти сразу же (через 2–6 мин) после повышения температуры, то в цианобактерии уровень CAT заметно возрастал лишь через 2–6 ч после термоиндукции и достигал 20-кратного увеличения после 18 ч культивирования при температуре 42 °С. Полученные результаты, по-видимому, отража-

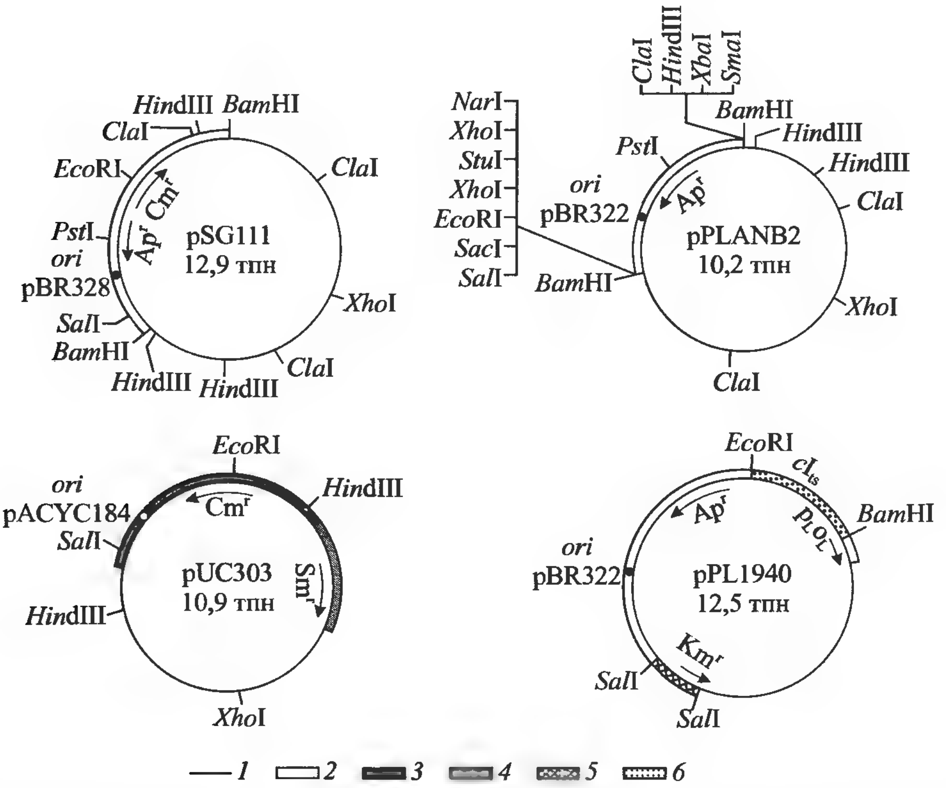


Рис. 9.12. Челночные векторные плазмиды, способные реплицироваться в *E. coli* и в *A. nidulans*:
1 — последовательность ДНК криптической плазмиды *A. nidulans*, *2* — плазмиды pBR322(328), *3* — pACYC184, *4* — pUC13, *5* — pDJ200, *6* — фага λ

ют общие закономерности метаболизма данной цианобактерии, характеризующейся относительно низкой скоростью роста.

Наряду с одноклеточными интересным объектом исследований являются нитевидные цианобактерии, которые способны фиксировать атмосферный азот в аэробных условиях в специализированных клетках, называемых гетероцистами. К наиболее изученным нитевидным цианобактериям относится *Anabaena* sp., и именно для нее К. Уолк с соавторами (1984 г.) разработали удобную векторную систему. Бифункциональные векторные плазмиды состоят из репликона криптической плазмиды pDU1 нитевидной цианобактерии *Nostoc*, части плазмиды pBR322, необходимой для репликации и мобилизации, а также детерминант устойчивости к различным антибиотикам. При конструировании векторов были полностью удалены участки гидролиза рестриктазами *Ava*I и *Ava*II, что обеспечило независимость этих плазмид от систем рестрикции *Anabaena* и повысило уровень их трансконъюгации (мобилизации плазмидами IncP) из клеток *E. coli* в *Anabaena* sp. Создание клонирующих и экспрессирующих векторов цианобактерий позволяет надеяться на то, что в ближайшие годы будет достигнут значительный прогресс в познании структурно-функциональной организации генетических систем цианобактерий, детерминирующих оксигенный фотосинтез и фиксацию молекулярного азота.

Рассмотренный подход к конструированию челночных плазмид был реализован и для архебактерий, после того как Л. Мэйл с соавторами (1983 г.) обнаружили криптическую плазмиду pME2001 (4,5 тпн) в клетках анаэробной архебактерии *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Объединяя *in vitro* рестриктазно-лигазным методом репликон pME2001 с плазмидами pKT240 или pBR322, в 1985 г. получили гибридные плазмиды, способные реплицироваться не только в архебактерии, но и в широком круге грамотрицательных эубактерий (для pKT240) или в клетках *E. coli* (для pBR322).

Таким образом, накопленный опыт демонстрирует, что клонирующие векторные системы можно разработать для любых прокариотических организмов. Необходимым условием является лишь наличие репликона, способного обеспечить размножение гибридных молекул ДНК в изучаемых клетках автономно от бактериальной хромосомы, а также возможность экспрессии выявляемых фенотипически генетических маркеров. Часто для упрощения процедур получения и отбора целевых гибридных молекул ДНК создают бифункциональные (челноч-

ные) плазмиды, при этом *E. coli* используют в качестве промежуточного хозяина, на котором селектируют и амплифицируют индивидуальные гибридные ДНК, проводят их первичный анализ, а затем вводят в бактерии других таксономических групп.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Биотехнология: Учеб. пособие для вузов. В 8 кн. / Под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. Кн. 2. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов / В. Г. Дебабов, В. А. Лившиц. М.: Высш. шк., 1988. 208 с.

Кристофер Ф., Франклин Х. Векторы для грамотрицательных бактерий, имеющие широкий спектр хозяев // Клонирование ДНК. Методы / Под ред. Д. Гловера. М.: Мир, 1988. С. 206–229.

Пехов А. П. Плазмиды бактерий. М.: Медицина, 1986. 224 с.

Чистосердов А. Ю., Еремашвили М. Р., Машко С. В. и др. Экспрессия гена человеческого интерферона F в облигатном метилотрофе *Methylobacillus flagellatum* КТ и *Pseudomonas putida* // Молек. генет., микробиол., вирусол. 1987. № 8. С. 36–41.

Bagdasarian M., Lurz R., Ruchert B. et al. Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, PSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas* // Gene. 1981. Vol. 16. P. 237–247.

Ditta G., Schidhauser T., Yakobson E. et al. Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression // Plasmid. 1985. Vol. 13. P. 149–153.

Ditta G., Stanfield S., Corbin D., Helinski D. R. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. Vol. 77. P. 7347–7351.

Egerton J. R., Cox P. T., Anderson B. J. et al. Protection of sheep against footrot with a recombinant DNA-based fimbrial vaccine // Veterinari Microbiol. 1987. Vol. 14. P. 393–409.

Fani R., Bazzicalupo M., Ricci F. et al. A plasmid vector for the selection and study of transcription promoters in *Azospirillum brasilense* // FEMS Microbiol. Lett. 1988. Vol. 50. P. 271–276.

Frey J., Bagdasarian M., Feiss D. et al. Stable cosmid vectors that enable the introduction of cloned fragments into a wide range of gram-negative bacteria // Gene. 1983. Vol. 24. P. 299–308.

Guiney D. G., Bouic K., Hasegawa P., Matthews B. Construction of shuttle cloning vectors for *Bacteroides fragilis* and use in assaying foreign tetracycline resistance gene expression // Plasmid. 1988. Vol. 20. P. 17–22.

Keen N. T., Tamaki S., Kobayashi D., Trollinger D. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria // Gene. 1988. Vol. 70. P. 191–197.

Mattick J. S., Bills M. M., Anderson B. J. et al. Morphogenetic expression of *Bacteroides nodosus* fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa* // J. Bacteriol. 1987. Vol. 169. P. 33–41.

Mermod N., Ramos J. L., Lehrbach P. R., Timmis K. N. Vector for regulated expression of cloned genes in a wide range of gram-negative bacteria // J. Bacteriol. 1986. Vol. 167. P. 447–454.

Novick R. P., Clowes R. C., Cohen S. N. et al. Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal // Bacteriol. Rev. 1976. Vol. 40. P. 168–189.

Pagratis N. Construction of a regulated broad host range T7 polymerase/promoter expression system // Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells / Eds. J. H. Miller, M. P. Calos. Cold Spring Harbor, N. Y., 1987. P. 5–9.

Sakaguchi K. Vectors for gene cloning in *Pseudomonas* and their applications // Curr. Topics in Microbiol. Immunol. 1982. Vol. 86. P. 31–45.

Sanchez J., Holmgren J. Recombinant system for overexpression of cholera toxin B subunit in *Vibrio cholerae* as a basis for vaccine development // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. Vol. 86. P. 481–485.

Sharpe G. S. Broad host range cloning vectors for gram-negative bacteria // Gene. 1984. Vol. 29. P. 93–102.

Wolk C. P., Vonshak A., Kenoe P., Elhai J. Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. Vol. 81. P. 1561–1565.

Глава 10
ГЕННО-ИНЖЕНЕРНАЯ СИСТЕМА ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

В предыдущих главах продемонстрированы удивительные возможности генетической инженерии на *E. coli* и некоторых других грамотрицательных бактериях. Однако система клонирования и экспрессии чужеродных генов в грамотрицательных бактериях имеет и определенные недостатки, часть из которых можно преодолеть, используя в качестве клеток — хозяев гибридных молекул ДНК грамположительные бактерии, и прежде всего представителей рода *Bacillus*.

Основным преимуществом бацилл с точки зрения создания молекулярных векторов является их способность секретировать из клеток в культуральную среду большие количества определенных белков. Это связано с тем, что клеточная стенка у грамположительных бактерий организована более просто, чем у грамотрицательных. Исходя из общности механизмов секреции белков через плазматическую мембрану в клетках различных типов, чрезвычайно заманчиво конструировать методами генетической инженерии гибридные гены, в которых чужеродная кодирующая последовательность состыкована с ген-эквивалентом сигнального пептида какого-либо секретируемого белка *Bacillus*. Если детерминируемый таким искусственным геном химерный продукт будет способен секретироваться в культуральную среду, то это значительно упростит очистку изучаемого белка. Возможно, в таком случае чужеродный белок в бактерии будет синтезироваться интенсивнее, чем в варианте без секреции, так как он в меньшей степени будет нарушать метаболизм клеток. Данное направление исследований — изучение механизма секреции, создание векторов экспрессии–секреции — в генетической инженерии бацилл имеет большое практическое значение, и оно развивается наиболее интенсивно. Многие виды бацилл, в том числе и самый изученный из них вид *Bacillus subtilis* (сенная палочка), активно используются микробиологической промышленностью для производства ферментов, антибиотиков, аминокислот и др. Поэтому разработаны методы крупномасштабного культивирования этих микроорганизмов и очистки продуктов их биосинтеза.

B. subtilis — непатогенная бактерия, поэтому она более перспективна, чем *E. coli* (условный патоген, представитель естественной микрофлоры кишечника человека и животных), для создания штаммов, продуцирующих фармацевтические вещества.

Бациллы относятся к спорообразующим бактериям. Формирование спор — это многоэтапный процесс своеобразной дифференцировки, и поэтому он представляет особый интерес для фундаментальной науки. Данный процесс контролируется большим числом хромосомных генов, но пока лишь в общих чертах ясно, как регулируется их функционирование. Решение этой проблемы также зависит от разработки методов клонирования генов в *B. subtilis*.

Генно-инженерные эксперименты на клетках *B. subtilis* и других видов рода *Bacillus* показали перспективность использования этих бактерий для разработки с помощью методов генетической инженерии высокоэффективных технологий микробиологического синтеза различных полипептидов, а также некоторых низкомолекулярных соединений. Генно-инженерная методология способствует бурному развитию молекулярной генетики *B. subtilis*, позволяет изучать процессы регуляции экспрессии целевых генов.

10.1. ВВЕДЕНИЕ МОЛЕКУЛ ДНК В КЛЕТКИ *BACILLUS*

10.1.1. Строение клеточной стенки грамположительных бактерий

Как и у грамотрицательных бактерий, содержимое грамположительной клетки ограничено бислойной фосфолипидной плазматической мембраной (рис. 10.1), в состав которой входят также интегральные белки мембран и гликолипиды. Протопласт грамположительной клетки окружен толстой клеточной стенкой (20–80 нм), в основном состоящей из пептидогликана. В отличие от грамотрицательных клеток у грамположительных пептидогликан образует трехмерный волокнистый матрикс, имеющий до 40 слоев. Полисахаридные цепи пептидогликана связаны друг с другом пептидными цепочками. Пептидогликановый матрикс стенки ковалентно связан с другими ее макромолекулярными компонентами, которые имеются только у грамположительных бактерий, — тейхоевыми кислотами. Тейхоевые кислоты — это растворимые в воде полимеры, содержащие остатки глицерина или рибита, соединенные между собой фосфодиэфирными связями (рис. 10.2). Цепи тейхоевых кислот могут быть длинными и включать до 30 и более элементов. Тейхоевые кислоты, расположенные перпендикулярно поверхности плазматической мембраны, соединены с пептидогликаном через OH-группы при атомах C^6 остатков N-ацетилмурамовой кислоты. Стенки большинства грамположительных бактерий не содержат липидов и белков.

Следствием фундаментальных различий в строении клеточных стенок бактерий является, в частности, то, что белок, преодолевший барьер плазматической мембраны грамположительной клетки, секретируется из цитоплазмы в окружающую среду, в то время как у грамотрицательной бактерии белку для выхода из клетки необходимо преодолеть еще внешнюю мембрану (см. 2.2.10). Кроме того, грамположительные бактерии высокочувствительны к воздействию лизоцима (расщепляет в пептидогликане гликозидную связь между остатками N-ацетилмурамовой кислоты и N-ацетилглюкозамина) и антибиотиков пенициллинового ряда (предотвращают синтез клеточной стенки).

10.1.2. Трансформация компетентных клеток

Большинство бактерий не обладают способностью адсорбировать и поглощать молекулы ДНК из внешней среды. Однако культуры неко-

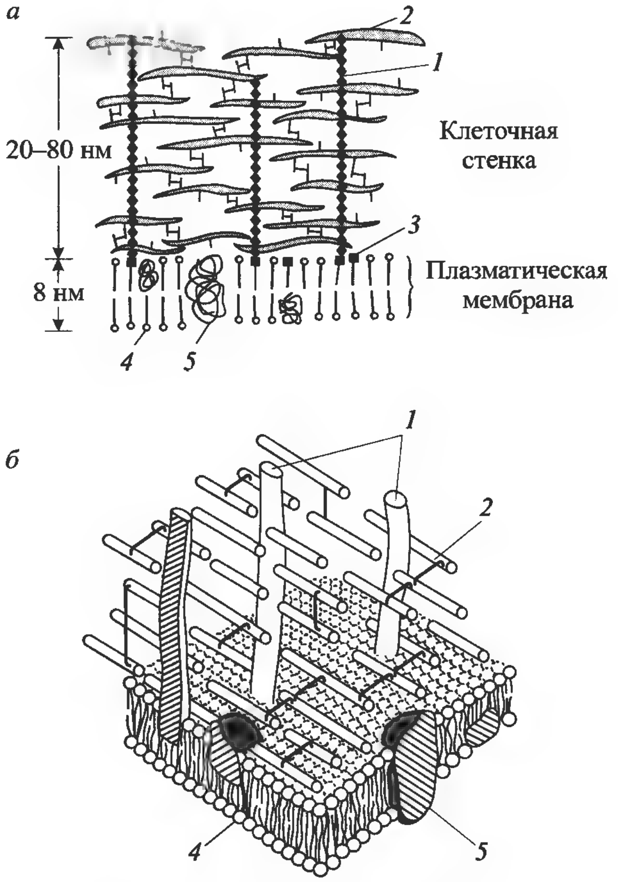


Рис. 10.1. Модель клеточной стенки и плазматической мембраны грамположительной бактерии в двумерном (*а*) и трехмерном (*б*) изображении:

1 — тейхоевая кислота; *2* — пептидогликан; *3* — гликолипид; *4* — фосфолипид; *5* — белок

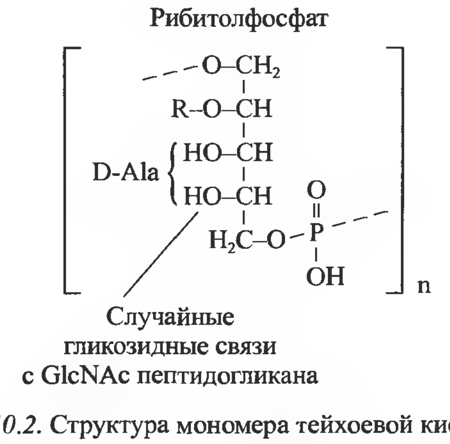


Рис. 10.2. Структура мономера тейхоевой кислоты клеток *B. subtilis*.

R — глюкоза; *D*-аланин присоединен к C^3 или C^4 рибита

торых видов бактерий (как грамположительных, так и грамотрицательных) при определенных условиях приобретают такую способность, т. е. переходят в компетентное состояние. Содержание компетентных клеток в таких культурах варьирует в широких пределах. Так, в компетентных культурах *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* к трансформации способна почти каждая клетка. В то же время, например, у *Micrococcus lysodeicticus* ДНК могут поглощать 3–4 %, а у *Aspergillus niger* — лишь 0,1–0,2 % всех клеток.

Bacillus subtilis относится к тем немногим хорошо изученным видам бактерий, которые обладают физиологической компетентностью. Впервые возможность генетической трансформации клеток *B. subtilis* препаратом очищенной хромосомной ДНК показал Дж. Спицайзен в 1958 г. Активные исследования, проведенные в последующие годы, позволили относительно подробно изучить этот процесс. У *B. subtilis*, как и у большинства других бактерий, компетентность возникает лишь на определенном этапе роста культуры. Для того чтобы стимулировать клетки к захвату ДНК, их выращивают на богатой среде, а затем переносят на бедную среду, где отсутствуют аминокислоты, необходимые ауксотрофным мутантам. Максимальная компетентность обычно достигается на поздней стадии логарифмического роста культуры *B. subtilis*. Такая культура может храниться при температуре –70 °C (при добавлении глицерина до 10 % по объему) с сохранением компетентности по крайней мере в течение 6 мес.

Компетентные клетки составляют не более 5–10 % всей популяции бактерий. Они отличаются от некомпетентных клеток по составу клеточной стенки, имеют сниженный поверхностный заряд и повышенную чувствительность к осмотическому шоку. Последнее, по-видимому, обусловлено тем, что у компетентных клеток имеются участки обнаженной плазматической мембраны. Предполагают, что именно с ними и взаимодействует трансформирующая ДНК. Компетентные клетки характеризуются пониженной метаболической активностью и меньшими размерами по сравнению с обычными клетками. Различие в размерах позволило выделить фракции компетентных клеток из культуры *B. subtilis* зональным центрифугированием в градиенте плотности сахарозы или ренографина и доказать, что экзогенная ДНК проникает только в компетентные клетки.

Процесс формирования компетентного состояния у *B. subtilis* контролируют не менее семи генов. Два из них функционируют начиная с ранних этапов роста культуры, а экспрессия остальных индуцируется в период перехода клеток в компетентное состояние, т. е. является стадиеспецифичной. Белки, обеспечивающие компетентность *B. subtilis*, участвуют в процессах связывания (адсорбции), проникновения и рекомбинации (интеграции) донорной ДНК.

Вскоре после адсорбции в молекуле ДНК происходят двухцепочечные разрывы и она распадается на фрагменты размером около 14 тпн. После этого одна цепь фрагмента ДНК гидролизуется специфичной нуклеазой, а другая проникает в клетку, частично разрушаясь с концов в результате нуклеазной атаки. Полагают, что источником энергии для перемещения ДНК через плазматическую мембрану служит протондвижущая сила. (Вещества, снижающие мембранный потенциал, подавляют перенос ДНК в цитоплазму.)

Для связывания двухцепочечной ДНК с поверхностью клетки *B. subtilis* необходимо участие белка 38,5K. Этот белок специфичен для компетентного состояния клетки и имеет молекулярную массу 38,5 кДа. Как показали Б. Восман с соавторами (1988 г.), важное значение для дальнейших этапов трансформации играет белковый комплекс 70K, а также белки 14K и 28K. Расположенный на плазматической мембране комплекс 70K состоит из двух субъединиц специфичной нуклеазы 17K и двух субъединиц белка 18K, являющегося регулятором активности данной нуклеазы. (Полагают, что 18K ингибирует нуклеазу 17K, предотвращая чрезмерный гидролиз молекул ДНК.) Белки 14K и 28K также представляют собой нуклеазы, специфичные для компетентного состояния. Причем белок 14K образуется в результате процессинга нуклеазы 17K, а 28K является димером 14K. В целом следует констатировать, что пока понятны лишь отдельные моменты процесса хромосомной трансформации компетентных клеток бацилл.

Тем не менее современный уровень знаний позволяет представить модель трансформации клеток *B. subtilis* (рис. 10.3, *1*). Вошедший в клетку одноцепочечный фрагмент ДНК при участии определенных белков может интегрироваться в гомологичную область хромосомы за счет комплементарного спаривания (синапсиса) между донорной и реципиентной ДНК. Внутри синаптической структуры происходят рекомбинация и репарация разрывов ДНК, в результате чего осуществляется ковалентная встройка экзогенной ДНК в бактериальную

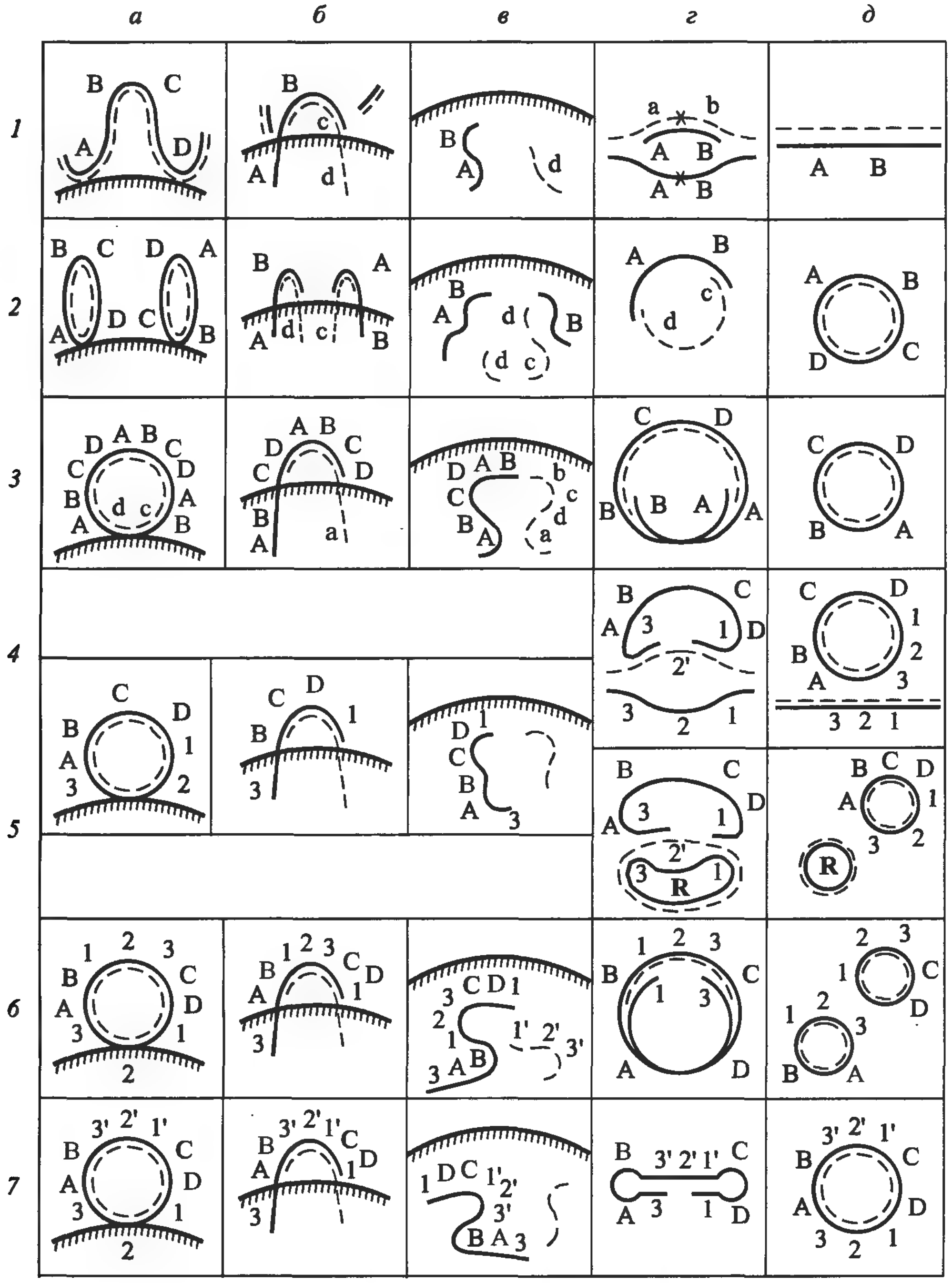


Рис. 10.3. Модели трансформации компетентных клеток *B. subtilis* разными типами молекул ДНК (*1–7*).
Этапы трансформации: *а* — связывание ДНК с компетентными клетками;
б — фрагментация и начало вхождения цепей ДНК в клетку; *в* — завершение процесса вхождения цепей ДНК;
г — комплементарное взаимодействие цепей ДНК внутри клетки (синапсис); *д* — образование конечных продуктов

хромосому. При этом мутантный локус бактериальной хромосомы заменяется (спасается) на локус дикого типа, присутствующий в трансформирующей ДНК, что можно легко выявить на соответствующих селективных средах.

В лаборатории Д. Дубнау получен ряд мутантов *B. subtilis*, у которых имелся дефект по рекомбинационной интеграции, но не были нарушены адсорбция ДНК и проникновение ее в клетку. У одного из этих мутантов, обозначенного *rec*E4, частота хромосомной трансформации была снижена более чем в 1000 раз. Оказалось, что продуктом гена *rec*E *B. subtilis* является белок, который, подобно белку RecA *E. coli*, играет важную роль в репарации и генетической рекомбинации. Следует отметить, что для успешной хромосомной трансформации бацилл кроме ферментов системы общей рекомбинации клеток необходимо наличие существенной гомологии протяженных последова-

тельностей донорного фрагмента и реципиентной хромосомной ДНК.

Знание основных этапов хромосомной трансформации клеток *B. subtilis* упростило разработку системы трансформации компетентных клеток бацилл молекулами плазмидных ДНК. Впервые плазмидную трансформацию *B. subtilis* осуществил С. Эрлих в 1977 г. Он ввел в данную бактерию плазмиды антибиотикоустойчивости pC194, pC221, pC223, pUB112 и pT127 из грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus* (золотистый стафилококк) и доказал, что они способны реплицироваться в гетерологичном окружении и экспрессировать гены устойчивости к антибиотикам.

С. Контен и Д. Дубнау в 1979 г. показали, что компетентность клеток *B. subtilis* для трансформации различными плазмидами формируется аналогично компетентности для хромосомной трансформации, а соотношение количества трансформантов и концентрации вводимой ДНК подчиняется зависимости первого порядка, т. е. для трансформации отдельной клетки достаточно одной плазмидной молекулы.

Удивительным оказался тот факт, что эффективную трансформацию компетентных клеток *B. subtilis* можно осуществлять лишь мультимерными формами плазмид, у которых полный плазмидный геном повторен в прямой ориентации («голова к хвосту») несколько раз. Необходимо отметить, что в препаратах плазмид такие формы всегда присутствуют в небольшом количестве, но их обычно не принимают во внимание. Эффективность же трансформации компетентных клеток *B. subtilis* специально очищенной мономерной суперкольцевой ДНК в 10^3–10^4 раз ниже, чем нефракционированным препаратом плазмиды, содержащим и мультимерные формы.

Анализ трансформированных клеток *B. subtilis* показал, что плазмидная ДНК проникает в компетентные клетки в виде линейных одноцепочечных структур. Цепи существенно деградируются с концов, поэтому при введении в компетентные клетки мономерных плазмид для образования трансформанта необходимо, чтобы в клетку попало не менее двух молекул ДНК. Для мультимерных форм плазмид достаточно единичной молекулы, чтобы обеспечить трансформацию.

Существует несколько моделей, описывающих процесс трансформации клеток *B. subtilis* плазмидами. При использовании мономерных форм (см. рис. 10.3, *2*) образование полноценной плазмиды если и происходит, то крайне редко, так как плазмидная ДНК, проникая в компетентную клетку, расщепляется в произвольной точке, а образующаяся одноцепочечная молекула гидролизуется с концов нуклеазами. Для мультимера (*3*) вероятность формирования нормальной плазмиды значительно увеличивается. Более того, как показал Д. Дубнау, частота плазмидной трансформации достаточно высока только при использовании тримеров или мультимеров более высокого порядка. При этом трансформация не зависит от системы генетической рекомбинации клетки.

На эффективность хромосомной трансформации не влияет система рестрикции реципиентной клетки, так как одноцепочечные фрагменты ДНК не являются субстратом для рестриктаз, а в образуемом с хромосомной ДНК дуплексе одна из нитей модифицирована. Уровень плазмидной трансформации для клеток с нативной системой рестрикции–модификации снижается, причем тем больше, чем больше мест действия данной рестриктазы имеется на плазмидной ДНК. Эти данные указывают на то, что, хотя в клетку входят индивидуальные цепи плазмидной ДНК, они затем могут формировать двухцепочечные участки (см. рис. 10.3, *г*), которые уже чувствительны к действию рестриктаз.

Особенности механизма плазмидной трансформации компетентных клеток *B. subtilis*, в частности, необходимость мультимерных форм плазмид, затрудняют клонирование фрагментов ДНК в составе гибридных плазмид в данной системе. Несомненно, получать *in vitro* мультимерные молекулы гибридных плазмид гораздо сложнее, чем мономерные. Поэтому было разработано несколько вариантов трансформации компетентных клеток *B. subtilis*, позволяющих использовать мономерные плазмиды.

В лаборатории Д. Дубнау в 1979 г. обнаружили, что компетентные клетки *B. subtilis* можно трансформировать мономерными плазмидами, если эти плазмиды содержат сегменты ДНК, гомологичные определенным последовательностям совместимой плазмиды, находящейся в трансформируемых клетках (***резидентной плазмиды***). Аналогичный подход реализовали Т. Траутнер с сотрудниками (1981 г.), введя в состав трансформируемой плазмиды фрагмент хромосомной ДНК *B. subtilis*. В обоих случаях, по-видимому, трансформация происходит по общему механизму за счет спасения донорной ДНК на гомологичных областях эндогенных молекул ДНК (хромосомы или резидентной плазмиды). Феномен спасения плазмид является *rec*-зависимым. Предполагаемый

механизм данного процесса следующий (см. рис. 10.3, *4*, *5*). Одноцепочечные линейные фрагменты плазмидной ДНК попадают в клетку, и, если разрыв плазмиды произошел в области гомологии донорной и реципиентной молекул ДНК, образуется синаптическая структура. В результате последующих процессов рекомбинации, репликации и заполнения брешей происходит спасение (восстановление структуры) донорной плазмиды. На эффективность плазмидной трансформации в такой системе существенное влияние могут оказывать размер участка гомологии молекул ДНК и конформация (суперскрученность) эндогенной ДНК.

Трансформация клеток бацилл мономерными плазмидами возможна также в том случае, если плазмида содержит протяженные повторяющиеся последовательности. Если повторы в плазмиде прямые, трансформация клеток ее мономерной формой происходит примерно по тому же механизму, что и трансформация мультимерными молекулами ДНК (см. рис. 10.3, *6*). Трансформация такими плазмидами сопровождается их распадом по повторам.

Протяженные инвертированные повторы, по-видимому, могут обусловливать образование в процессе трансформации одноцепочечной гантелевидной структуры (если разрыв плазмиды произошел в повторе). В результате заполнения бреши и репликации структура плазмидной ДНК восстановится (*7*).

Рассмотренные подходы позволяют в той или иной мере преодолевать трудности трансформации компетентных клеток *B. subtilis* мономерными плазмидами. Однако не всегда введение в состав плазмидной ДНК областей гомологии с бактериальной хромосомой или протяженных инвертированных повторов приводит к успешной трансформации клеток мономерными формами таких плазмид. Это означает, что природа вставки, дупликации или самой плазмиды может быть важна для проявления свойств, необходимых для образования внутримолекулярной синаптической структуры. Например, фрагмент ДНК *B. subtilis*, содержащий гены рибосомной РНК, не обеспечивает спасения гибридной плазмиды в процессе трансформации компетентных клеток *B. subtilis* мономерной плазмидой. Полагают, что интенсивная транскрипция генов рРНК препятствует образованию синаптической структуры между вводимой плазмидой и гомологичным районом хромосомной ДНК. По той же причине, вероятно, плазмида, содержащая рДНК мыши, не может рекомбинационно встраиваться в хромосомную ДНК культивируемых клеток мыши.

При использовании искусственных бирепликонных плазмид, способных размножаться как в *B. subtilis*, так и в *E. coli* (см. 10.2.3), мультимерные формы можно генерировать в клетках *E. coli*. Конструируемые *in vitro* мономерные гибридные плазмиды эффективно трансформируют клетки *E. coli*, а в процессе размножения в данной бактерии определенная часть плазмидных молекул приобретает мультимерное строение. Синтезированными в *E. coli* мультимерными плазмидами затем можно успешно трансформировать компетентные клетки *B. subtilis*.

Помимо рассмотренных оригинальных подходов существуют и другие, более простые способы введения плазмид в клетки бацилл.

10.1.3. Универсальные методы введения плазмид

Среди изученных грамположительных бактерий лишь у некоторых видов обнаружена физиологическая компетентность для генетической трансформации. К этим видам относятся *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus sanguis* и *Micrococcus lysodeicticus*. Необходимость разработки более универсального метода плазмидной трансформации различных грамположительных бактерий привела исследователей к изучению протопластов этих клеток.

При обработке лизоцимом в изотоническом растворе пептидогликан грамположительных клеток, формирующий клеточную стенку, разрушается, в результате чего образуются шаровидные протопласты. С. Чанг и С. Коэн в 1979 г. показали, что протопласты *B. subtilis*, обработанные полиэтиленгликолем, с высокой эффективностью трансформируются плазмидной ДНК. Дальнейшие исследования продемонстрировали универсальность такого методического приема. Плазмидная трансформация протопластов успешно осуществлена для многих штаммов бактерий разных видов, относящихся к родам *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Streptomyces*.

Плазмидная ДНК проникает в протопласты в двухцепочечной форме. Трансформация проходит с одинаковой эффективностью при использовании как мономерных суперкольцевой или открытой кольцевой форм, так и мультимерных форм. При этом могут быть трансформированы до 80 % протопластов. Зависимость числа трансформированных протопластов от

концентрации плазмидной ДНК у *B. subtilis* показывает, что для акта трансформации достаточно одной мономерной молекулы плазмиды. В процессе трансформации плазмида не претерпевает структурных изменений.

Так как плазмида входит в протопласт в виде двухцепочечной молекулы, система рестрикции–модификации клетки-реципиента будет существенно снижать эффективность трансформации при наличии в плазмиде соответствующих сайтов рестрикции. Аналогичная ситуация возникает также при введении в протопласты хромосомной ДНК.

Таким образом, с точки зрения введения плазмид в клетки протопласты бацилл, как и других грамположительных бактерий, имеют ряд несомненных преимуществ перед компетентными клетками. Протопласты с высокой эффективностью трансформируются мономерной формой плазмидных ДНК, что очень важно при конструировании гибридных молекул ДНК *in vitro*. Кроме того, используя протопласты, часто удается вводить плазмиды в штаммы грамположительных клеток, не обладающих физиологической компетентностью. Недостатками данного методического приема являются его относительная сложность, многоэтапность и, как следствие, слабая воспроизводимость по параметру эффективности трансформации.

Более прост и универсален метод электропорации, который начиная с 1988 г. стали использовать для бактерий рода *Bacillus*. По эффективности электропорация примерно соответствует методу протопластов, но значительно проще и быстрее в исполнении. Тем не менее для каждого вида (штамма) процедуру электропорации необходимо оптимизировать, чтобы добиться наибольшего уровня плазмидной трансформации.

Недостаток электропорации, как и плазмидной трансформации протопластов, состоит в том, что проникающая в цитоплазму двухцепочечная молекула ДНК не защищена от атаки эндогенных рестриктаз, что в ряде случаев может значительно усложнять проведение генно-инженерных манипуляций. Преодолеть данное затруднение позволяет использование принципа, экспериментально обоснованного П. Трьё-Кьетом с соавторами (1987 г.). Ими была создана челночная (бирепликонная) плазмида pAT187 (рис. 10.4), состоящая из репликона плазмиды *E. coli* pBR322, репликона стрептококковой плазмиды pAMβ1 с широким кругом хозяев среди грамположительных бактерий, гена устойчивости к канамицину, экспрессируемого как в грамположительных, так и в грамотрицательных бактериях, и области начала переноса *ori*T плазмиды RK2 группы IncP. Оказалось, что pAT187 может быть мобилизована конъюгативной плазмидой группы несовместимости IncP и перенесена из клеток *E. coli* в различные грамположительные бактерии, где она эффективно реплицируется за счет репликона pAMβ1. Так, был показан мобилизационный перенос pAT187 из *E. coli* в *Bacillus thuringiensis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus aureus*. Эффективность переноса варьировала от $2 \cdot 10^{-8}$ до $5 \cdot 10^{-7}$, что примерно на 6 порядков ниже эффективности переноса pAT187 из одного штамма *E. coli* в другой. Тем не менее даже такого уровня конъюгационной передачи плазмиды pAT187 от *E. coli* грамположительным бактериям достаточно для надежного выявления целевых плазмидосодержащих клонов.

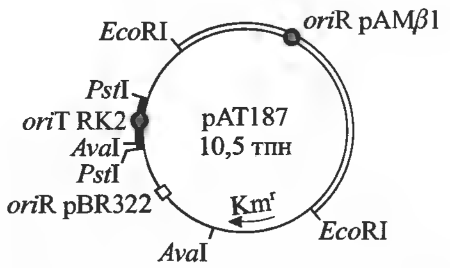


Рис. 10.4. Карта мобилизуемой челночной плазмиды pAT187.

*ori*R — область начала репликации, *ori*T — область начала переноса плазмидной ДНК

Таким образом, разработанный подход позволяет достаточно легко переносить гибридные плазмиды из *E. coli* в разные грамположительные бактерии, которые не обладают физиологической компетентностью. Более того, в процессе конъюгационной передачи в клетку-реципиент переносится одна цепь донорной плазмиды, на которой синтезируется затем комплементарная цепь ДНК. Это приводит к тому, что конъюгационно передаваемая плазмида не подвергается атаке рестриктаз — эндонуклеаз, специфично воздействующих на немодифицированные двухцепочечные молекулы ДНК.

10.1.4. Трансфекция

При изучении процесса трансфекции компетентных клеток *B. subtilis* молекулами двухцепочечных фаговых ДНК обнаружено, что мономерная форма ДНК фага имеет крайне низкую инфекционность. В то же время ДНК профага (хромосомная ДНК, содержащая интегри-

рованный фаговый геном), конкатемерная репликативная форма или мультимерная ДНК, полученная *in vitro* с помощью ДНК-лигазы, высокоактивны в трансфекции. Это указывает на то, что при трансфекции фаговая ДНК деградируется на концах. Кроме того, как оказалось, в клетки проникают лишь одноцепочечные фрагменты фаговой ДНК. В связи с этим трансфекция компетентных клеток *B. subtilis* зрелой (мономерной) фаговой ДНК происходит только в результате рекомбинационного взаимодействия в одной клетке нескольких таких молекул. При трансфекции конкатемерными ДНК начало фаговому потомству в компетентных клетках может дать уже единичная молекула.

Как и при плазмидной трансформации, эффективность трансфекции немодифицированной фаговой ДНК несколько снижается, если клетки бацилл содержат ферменты рестрикции–модификации. Следовательно, в компетентную клетку могут проникать фрагменты обеих цепей ДНК и образовывать в ней гомодуплексы, чувствительные к действию рестриктаз.

Трансфекция протопластов *B. subtilis* эффективнее трансфекции компетентных клеток в 10^3 раз. При этом фаговая ДНК проникает в протопласты в виде нативных двухцепочечных молекул. Трансфекция в данном случае является *rec*-независимой, и большое влияние на ее эффективность оказывает наличие или отсутствие R–M-систем.

Таким образом, очищенная фаговая ДНК проникает в клетки бацилл по тем же механизмам, что и хромосомная и плазмидная молекулы ДНК, т. е. рассматриваемые процессы не зависят от природы ДНК. Знание основных закономерностей вхождения экзогенных молекул ДНК в клетки *B. subtilis* или других грамположительных бактерий позволяет при планировании генно-инженерных экспериментов обоснованно выбирать тот или иной метод.

10.2. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЕКТОРЫ *BACILLUS*

10.2.1. Клонирующие векторы на основе плазмид стафилококков и стрептококков

Первые внехромосомные молекулы ДНК бацилл обнаружили В. Карлтон и Д. Хелинский (1969 г.) в клетках *B. megaterium*. В последующем в разных лабораториях были выделены и изучены многочисленные плазмиды из клеток *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. brevis* и др. Однако большинство этих плазмид либо оказались криптическими, либо детерминировали трудноселектируемые признаки, что создавало определенные трудности при разработке генно-инженерной системы бацилл. Усилия были направлены прежде всего на создание клонирующих векторов *B. subtilis* — самого изученного вида в биохимическом и генетическом аспекте среди грамположительных бактерий. Отсутствие собственных плазмид, которые могли бы составить основу удобных клонирующих векторов *B. subtilis*, побудило исследователей искать подходящих претендентов на эту роль среди плазмид других грамположительных бактерий.

В 1976 г. П. Ловетт с соавторами трансформировали штамм *B. subtilis* 168 бактериоциногенной плазмидой pPL10 из *B. pumilus* и показали, что плазмида стабильно сохраняется в гетерологичном окружении при множественных пересевах культуры *B. subtilis*[pPL10] и направляет синтез бактериоцина. Однако данный признак неудобно использовать в качестве маркера, так как не удается осуществлять прямой отбор клонов клеток *B. subtilis*, содержащих pPL10.

Толчок развитию генетической инженерии клеток *B. subtilis* дала работа С. Эрлиха (1977 г.), в которой продемонстрировано, что плазмиды *Staphylococcus aureus*, детерминирующие устойчивость к хлорамфениколу (pC194, pC221, pC223, pUB112) или тетрациклину (pT127), способны реплицироваться в клетках *B. subtilis* и обеспечивать устойчивость нового хозяина к соответствующему антибиотику. Во многих лабораториях начали интенсивно изучать плазмиды антибиотикоустойчивости стафилококков и использовать их для создания клонирующих векторов. Наиболее подробно были изучены такие плазмиды *S. aureus*, как pC194, pT181, pUB110 (рис. 10.5) и pE194. Расшифрована полная нуклеотидная последовательность этих плазмид и установлена их генетическая организация. Оказалось, что они принадлежат к разным группам несовместимости (Inc8, Inc3, Inc13 и Inc11 соответственно), но могут быть отнесены к одному классу малых многокопийных плазмид, обладающих рядом очень интересных свойств.

Наиболее важные результаты при исследовании этого класса плазмид получены тремя группами ученых, руководимыми С. Эрлихом, Р. Новиком и Дж. Алонсо. Доказано, что данные плазмиды реплицируются по механизму катя-

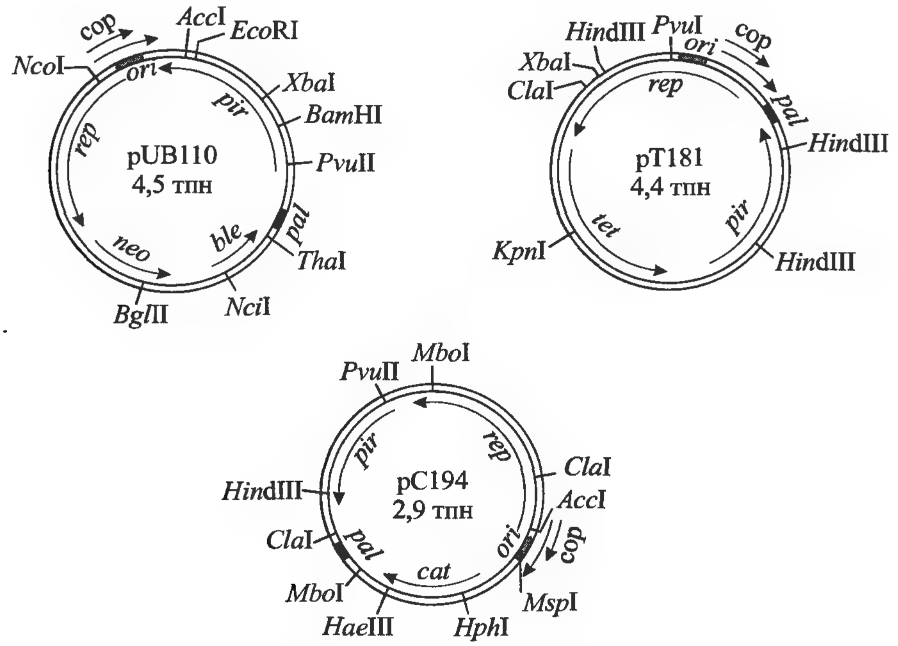


Рис. 10.5. Плазмиды *S. aureus*, реплицирующиеся в *B. subtilis*.

pir — ген белка сайтспецифической *rec*A-независимой рекомбинации, которая необходима для распада мультимерных форм на мономерные

щегося кольца и в качестве промежуточной репликативной формы имеют одноцепочечную кольцевую молекулу ДНК. Каждая плазмида кодирует специальный белок Rep (не комплементирующий аналогичную функцию другой плазмиды этого класса), который является положительным регулятором процесса репликации плазмиды. Уровень синтеза белка Rep контролируется антисмысловыми РНК, которые считываются с гена *cop* и, связываясь с 5′-концевым районом матричной РНК белка Rep, подавляют ее трансляцию (негативная регуляция).

Своеобразен механизм репликации этих плазмид (рис. 10.6). Белок Rep взаимодействует на суперскрученной двухцепочечной плазмидной ДНК с участком *ori* (25 пн для плазмиды pUB110) и расщепляет одну из цепей. При этом белок Rep ковалентно соединяется с 5′-концом разорванной цепи ДНК. В результате создаются условия, обеспечивающие присоединение в участке разрыва клеточных ферментов, в том числе ДНК-полимеразы III. Образовавшийся ферментный комплекс направляет процесс асимметричной плазмидной репликации, в ходе ко-

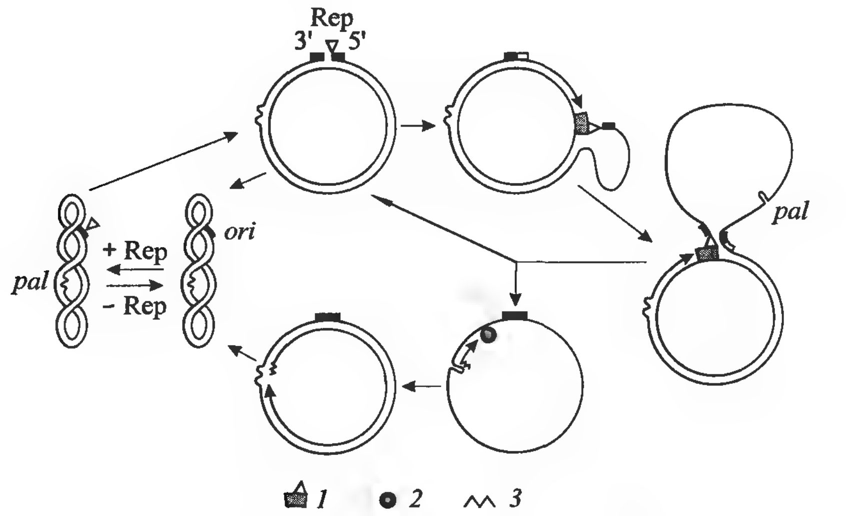


Рис. 10.6. Модель репликации плазмид *S. aureus*:

1 — ферментный репликационный комплекс; *2* — ферментный полимеразный комплекс; *3* — РНК-затравка. Стрелки указывают направление синтеза комплементарных цепей ДНК

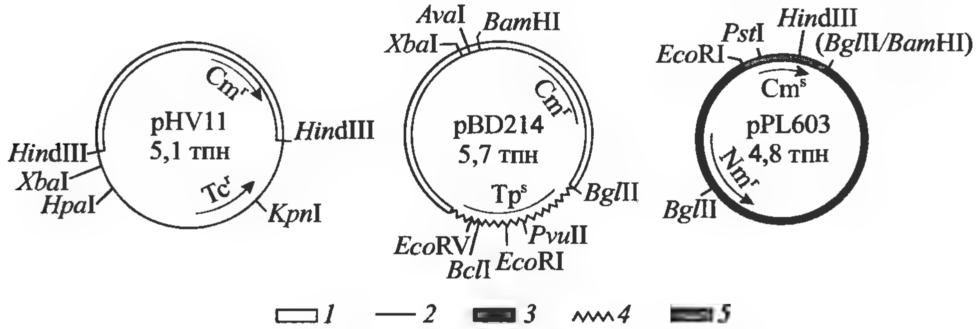


Рис. 10.7. Векторные плазмиды *B. subtilis*:

1 — последовательность ДНК pC194, *2* — pT127, *3* — pUB110, *4* — фага *β*22, *5* — *B. pumilis*

торого разрезанная цепь вытесняется вновь синтезируемой. После полного цикла репликации наряду с двухцепочечной молекулой, содержащей разрыв в одной цепи, образуется одноцепочечная кольцевая форма плазмиды (см. рис. 10.6). Важно подчеркнуть, что участки инициации и терминации репликации в сегменте *ori* перекрываются, но не совпадают.

На образовавшейся одноцепочечной кольцевой ДНК имеется сегмент *pal* с палиндромной последовательностью, способной формировать шпилечную структуру. На этой шпильке инициируется ориентированный синтез комплементарной цепи ДНК. Механизм синтеза пока не ясен, но полагают, что он аналогичен изученному для мелких фагов *E. coli* типа *ϕ*X174, у которых на шпильке образуется РНК-затравка и с ней взаимодействуют ферменты, обеспечивающие синтез комплементарной цепи ДНК. В сбалансированной системе эффективной репликации плазмид по рассмотренному механизму одноцепочечная форма составляет лишь 3–5 % суммарной плазмидной ДНК. Если же взаимодействие ферментов и ДНК по той или иной причине нарушено (мутации в плазмиде или гетерологичные клеточные ферменты), содержание одноцепочечной формы может значительно увеличиться, что приводит к снижению копийности плазмиды и нестабильности ее сохранения в бактериальной культуре.

Участок *ori* всех четырех рассматриваемых плазмид функционирует как в клетках *S. aureus*, так и в *B. subtilis*, а сегмент *pal* плазмид pC194, pT181 и pE194 в *B. subtilis* слабоактивен. Это приводит к тому, что около 1/3 препарата данных плазмид в *B. subtilis* представлено одноцепочечной кольцевой ДНК. В то же время локус *pal* pUB110 эффективно узнается ферментами обеих бактерий, поэтому и в гетерологичном окружении pUB110 находится в основном в двухцепочечной форме. Это единственная из изученных плазмид стафилококков, стабильно поддерживающаяся в клетках *B. subtilis*.

Плазмида pUB110 получила широкое распространение в качестве клонирующего вектора. Она является многокопийной, несет два селективных маркера — устойчивость к неомицину или канамицину (ген *neo*) и к блеомицину или флеомицину (*ble*), а также содержит уникальные участки гидролиза рестриктазами *Eco*RI, *Xba*I, *Bam*HI, *Acc*I, *Pvu*II, *Nci*I и *Bgl*II, по которым можно клонировать экзогенные фрагменты ДНК без нарушения функций репликации плазмиды. При этом селективный отбор гибридных вариантов возможен только при встройке фрагментов по участку *Bgl*II (Nm^sBl^r) или *Nci*I (Nm^rBl^s). Как уже отмечалось, pUB110 стабильно поддерживается в клетках *B. subtilis*. Кроме того, она может быть перенесена из *B. subtilis* в другие виды бацилл путем трансдукции фагами PBS1 или SP10, что методически значительно упрощает проведение экспериментов.

Один из первых генно-инженерных экспериментов на *B. subtilis* выполнен в 1978 г. С. Эрлихом. В состав плазмиды pC194 был встроен *Hin*dIII-фрагмент плазмиды pT127, несущий ген, который кодирует устойчивость клеток к тетрациклину. Исходную плазмиду pC194 можно использовать в качестве клонирующего вектора, так как она содержит единственное место гидролиза рестриктазой *Hin*dIII, и при встройке в нее *Hin*dIII-фрагментов ДНК не нарушаются функции репликации плазмиды и ген *cat* хлорамфениколацетилтрансферазы. Гибридная плазмида, обозначенная pHV11, детерминирует устойчивость сразу к двум антибиотикам — хлорамфениколу и тетрациклину (рис. 10.7) и является более удобным по сравнению с pC194 клонирующим вектором.

К. Кеггинс с соавторами (1978 г.) встроили в pUB110 фрагменты хромосомной ДНК разных видов *Bacillus*, образовавшиеся в результа-

Таблица 10.1. **Свойства гибридных плазмид на основе pUB110**

Плазмида	Источник клонированного фрагмента ДНК	Размер, тпн	Комплементационная активность							
			*aro*B	*trp*						*his*-2
				E	D	C	F	B	A	
pUB110	—	4,5	0	0	0	0	0	0	0	0
pSL101	*B. licheniformis* 749C	8,1	0	0	0	+	+	+	+	0
pSL103	*B. pumilus* NRRLB-3275	7,5	0	+	+	+	+	0	0	0
pSL104	*B. pumilus* NRS576	7,5	0	0	±	+	+	0	0	0
pSL105	*B. licheniformis* 9945A	8,1	0	0	±	+	+	0	0	0
pSL106	*B. subtilis* 168	6,8	0	0	0	+	+	0	0	0

Примечание. Комплементационная активность определялась в *B. subtilis*: 0 — мутация не комплементировалась, «+» — комплементировалась, «±» — комплементировалась, но клетки росли медленно.

те гидролиза *Eco*RI. После трансформации гибридными плазмидами клеток *B. subtilis*, дефектных по рекомбинации (благодаря мутации *rec*E4 предотвращается рекомбинация клонированных фрагментов с хромосомой реципиентной клетки) и мутантных по гену *trp*C, удалось на селективной среде отобрать клоны клеток, в которых клонированные гены комплементировали последнюю мутацию. Дополнительный анализ показал, что кроме гена *trp*C в клонированных фрагментах содержатся и некоторые другие гены *trp*-оперона (табл. 10.1).

Серия плазмидных векторов клеток *B. subtilis* создана в лаборатории Д. Дубнау (1978–1980 гг.). Исследователи использовали пять плазмид *S. aureus* (табл. 10.2). Комбинируя их *in vitro* рестриктазно-лигазным методом, удалось получить векторные производные серии pBD (табл. 10.3). Некоторые гибридные плазмиды оказались структурно нестабильными, а их стабильные варианты получились в результате делеций, произошедших *in vivo*. Важным преимуществом полученных клонирующих векторов по сравнению с исходными плазмидами является то, что они несут несколько детерминант устойчивости к антибиотикам. Это значительно упрощает и повышает надежность отбора гибридных плазмид на основе таких векторов. Инактивируя в результате встройки один или два маркера плазмиды, клоны трансформантов можно отбирать по другому нативному маркеру вектора.

Важно, что в штамме *B. subtilis ts dna*C30, в котором при повышенной температуре прекращается репликация хромосомной ДНК, синтез ДНК плазмид pUB110, pC194 и их производных продолжается и копийность плазмидных молекул может достигать 10^3 на клетку. Использование данного мутантного штамма и векторов на основе плазмид pUB110 и pC194 позволяет получать высокую копийность клонированных генов.

Рассмотренные плазмиды — векторы с негативной селекцией, так как гибридные молекулы ДНК выявляются по инактивации определенных генов устойчивости к антибиотикам. Первоначально на агаризованной селективной среде с определенным антибиотиком отбирают клоны клеток, содержащих или гибридные, или исходную плазмиды, а лишь затем перепечаткой на среду с антибиотиком, ген устойчивости к которому в гибридных плазмидах должен быть нарушен, выявляют клоны гибридов.

Несомненные преимущества в ряде случаев имеют векторы с позитивной системой отбора гибридов, так как они позволяют осуществлять прямую селекцию клеток, несущих гибридные плазмиды. Наибольшие успехи в данном направлении достигнуты для клеток *E. coli* (см. 2.2.8). Первую систему прямой селекции гибридных плазмид в *B. subtilis* предложили Т. Грижан и Д. Дубнау (1982 г.). Они основывались на том, что быстро делящиеся клетки бактерий нуждаются в большом количестве нуклеотидов для образования нуклеиновых кислот. При этом свободные дезоксинуклеозидтрифосфаты присутствуют в клетках в очень малой

Таблица 10.2. **Свойства некоторых плазмид *S. aureus***

Плазмида	Селективные маркеры	Размер, тпн	Число участков гидролиза рестриктазой		
			*Xba*I	*Hpa*II	*Eco*RI
pC194	Cm^r	2,9	0	1	0
pE194	Em^r	3,7	1	2	0
pSA0501	Sm^r	4,0	1	2	1
pUB110	Nm^rBl^r	4,5	1	4	1
pSA2100	Sm^rCm^r	6,9	1	3	1

Таблица 10.3. **Свойства гибридных плазмид серии pBD**

Плазмида	Родительские плазмиды	Селективные маркеры	Размер, тпн	Рестриктазы с единичными участками гидролиза	Инактивируемый селективный маркер
pBD6	pUB110 pSA0501[*1)]	$Nm^rBl^rSm^r$	8,7	*Bam*HI *Tac*I *Hin*dIII *Bgl*II	— — Sm^r Nm^r
pBD8	pUB110 pSA2100[*1)]	$Nm^rBl^rCm^rSm^r$	9,0	*Bam*HI *Xba*I *Hin*dIII *Eco*RI *Bgl*II	— — Sm^r Sm^r Nm^r
pBD9	pUB110[*1)] pE194	$Nm^rBl^rEm^r$	8,1	*Bam*HI *Eco*RI *Pst*I *Tac*I *Bgl*II *Hpa*I *Bcl*I	— — — — Nm^r Em^r Em^r
pBD10	pBD8 pE194[*2)]	$Nm^rBl^rCm^rEm^r$	6,6	*Bam*HI *Xba*I *Bgl*II *Bcl*I *Hpa*I	— — Nm^r Em^r Em^r
pBD12	pUB110 pC194[*3)]	Nm^rCm^r	6,7	*Bam*HI *Hin*dIII *Eco*RI *Xba*I *Tac*I *Bgl*II	— — — — — Nm^r
pBD64	pBD12[*4)]	Nm^rCm^r	4,8	*Bam*HI *Eco*RI *Xba*I *Tac*I *Bgl*II	— — — — Nm^r

[*1)] Комбинирование с помощью рестриктазы *Xba*I.
[*2)] Комбинирование с помощью рестриктазы *Xba*I, делеция *in vivo*.
[*3)] Комбинирование с помощью *Xba*I.
[*4)] Делеция *in vivo*.

концентрации. Это свидетельствует о том, что синтез дезоксинуклеотидов является лимитирующей стадией при синтезе ДНК. Для сбалансированного роста и размножения клеток требуется большое количество нуклеозидтрифосфатов, причем в нужном соотношении. Исходя из этого, рост бактерий можно эффективно ингибировать, подавляя синтез каких-либо нуклеотидов.

Так, триметоприм является ингибитором дигидрофолатредуктазы и блокирует восстановление дигидрофолата до тетрагидрофолата, который необходим при синтезе пуринов и тимидилата (см. рис. 13.3). Если в клетках тимидилатсинтетаза высокоактивна, то в присутствии триметоприма происходит быстрое расходование пула тетрагидрофолата, и это приводит к ингибированию роста бактерий. Таким образом, клетки бактерий с нативным геном тимидилатсинтетазы *thy* в выбранных условиях высокочувствительны к триметроприму (Tp^s). Клетки же с дефектным геном thy^- проявляют устойчивость к данному антиметаболиту (Tp^r). Исходя из этого на основе плазмиды pBD64 и фрагмента ДНК фага β22, содержащего ген *thy*, была создана плазмида pBD214 (см. рис. 10.7). В данной плазмиде инактивация гена *thy* может происходить при встройке фрагментов ДНК по

уникальным участкам гидролиза *Eco*RI, *Bcl*I, *Pvu*II и *Eco*RV. В штамме *B. subtilis thy⁻* плазмида pBD214 обеспечивает фенотип Tp^s, а гибриды, в которых ген *thy* нарушен, — Tp^r. Поэтому на агаризованной селективной среде с хлорамфениколом и триметопримом колонии могут формировать только клетки *B. subtilis thy⁻*, трансформированные гибридными плазмидами на основе pBD214, т. е. после трансформации лигазной смесью будут выявляться только гибридные клоны.

Регуляторные элементы генов *B. subtilis* имеют специфичное строение (см. 10.3.1), поэтому при генно-инженерном конструировании штаммов-продуцентов возникает необходимость выделения промоторов *B. subtilis* и их использования. Важное значение имеют плазмидные векторы, предназначенные для отбора промоторсодержащих фрагментов ДНК. Первый плазмидный вектор данного типа создали П. Ловетт с сотрудниками (1981 г.). В составе pUB110 они клонировали *Eco*RI-фрагмент хромосомной ДНК *B. pumilis*, содержащий ген *cat*. Гибридную плазмиду, детерминирующую фенотип клеток Nm^rCm^r, обозначили pPL531. На основе pPL531 в результате генно-инженерных реконструкций была создана плазмида pPL603 (см. рис. 10.7), в которой делетирована промоторная область клонированного гена хлорамфениколацетилтрансферазы. После встройки в pPL603 по местам гидролиза рестриктазами *Eco*RI или *Pst*I любых фрагментов ДНК на агаризованной среде с хлорамфениколом вырастают только колонии клеток *B. subtilis*, содержащих гибридные плазмиды, у которых встроенные фрагменты выполняют функции промоторов и направляют транскрипцию в сторону кодирующей последовательности *cat*. При этом можно косвенно, по уровню устойчивости к антибиотику, оценить силу клонированных промоторов или промотороподобных последовательностей. Спектр анализируемых рестрикционных фрагментов можно расширить, встроив перед структурной частью гена *cat* полилинкер, содержащий участки узнавания различных рестриктаз. Так, заменив *Eco*RI–*Pst*I-фрагмент (203 пн) плазмиды pPL603 на полилинкер (21 пн) из состава M13mp7, сконструировали плазмиду pPL703.

Важным свойством векторов pPL603 и pPL703 является то, что перед структурной частью гена *cat* находится участок (палиндромная последовательность), ответственный за индукцию экспрессии гена субингибирующими концентрациями хлорамфеникола. Механизм этой индукции точно не известен, но по одному из предположений хлорамфеникол способен стабилизировать шпилечную структуру на 5′-конце мРНК *cat* и тем самым увеличивать время полужизни матрицы, что приводит при малых концентрациях антибиотика к возрастанию синтеза белка. Поэтому, если использовать промоторсодержащие производные рассматриваемых векторов и встраивать какие-либо кодирующие последовательности в структурную часть гена *cat* (например, по сайту *Hin*dIII, см. рис. 10.7), экспрессия клонированных чужеродных генов также будет индуцироваться хлорамфениколом.

У бацилл имеется большое разнообразие σ-факторов, а следовательно, специфичностей РНК-полимеразы (см. 10.3.1), поэтому особый интерес представляет выделение промоторов различных групп. Так, в векторе pPL703 были клонированы промоторные фрагменты из хромосомной ДНК *B. subtilis*. При анализе отобранных клонов на возможность продуцировать CAT в экспоненциальной и стационарной фазах роста культуры обнаружены фрагменты, направляющие транскрипцию лишь в постэкспоненциальной фазе. Таким образом, разработанная векторная система позволяет не только клонировать промоторные фрагменты ДНК, но и характеризовать их.

О. Карми с соавторами (1987 г.) предложили использовать бактериальную люциферазу для отбора промоторов и контроля за их функционированием *in vivo*. Преимущество такого подхода прежде всего состоит в том, что для оценки уровня люциферазы не требуется разрушать клетки (что необходимо делать при количественном анализе CAT, β-галактозидазы или других тест-белков), поскольку она катализирует специфическую реакцию с излучением света. Продукцию света бактериальной люциферазой можно легко измерить с помощью фотоумножителя, и она линейно зависит от количества синтезированного фермента.

Для реализации данного подхода в состав бактериальной плазмиды pVH33 встроили беспромоторный сегмент люциферазного (*lux*) оперона *Vibrio fischeri*. В полученной плазмиде pOC1 перед *lux*-опероном находится уникальный участок *Sma*I, по которому можно встраивать чужеродные фрагменты ДНК и анализировать их промоторную активность по свечению клеток. Вектор pOC1 был использован для клонирования ряда промоторов из состава хромосомной ДНК *B. subtilis* и *B. megaterium* и анализа функционирования промоторных областей

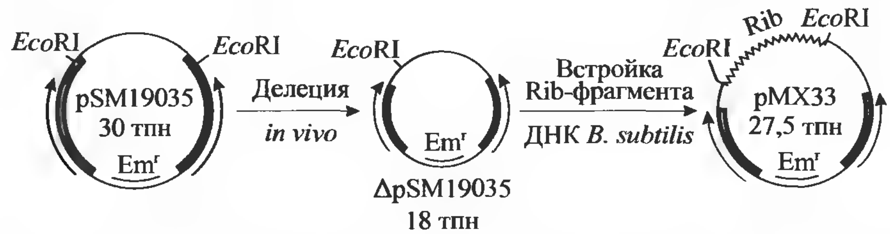


Рис. 10.8. Образование векторной плазмиды ΔpSM19035, способной обеспечивать трансформацию клеток *B. subtilis* мономерными формами гибридных плазмид, и ее использование на примере клонирования рибофлавинового оперона (Rib).

Черными блоками обозначены инвертированные повторы

в процессе развития культуры *B. subtilis* и образования спор. Этот подход, по-видимому, очень перспективен для исследования тонких механизмов такого сложного процесса дифференцировки, каким является споруляция бацилл.

В настоящее время имеется достаточный набор векторных молекул для проведения широкого спектра генно-инженерных экспериментов в клетках бацилл. Недостаток этих векторов состоит в том, что они не способны в мономерной форме трансформировать компетентные клетки *B. subtilis*. Качественно новые векторы для бацилл удалось создать на основе некоторых плазмид грамположительных бактерий рода *Streptococcus*.

А. С. Бойцов и В. И. Голубков (1980 г.) обнаружили, что плазмиды стрептококков могут эффективно трансформировать *B. subtilis* и обусловливать их устойчивость к антибиотикам. При этом наибольшая эффективность трансформации и стабильность поддержания характерна для плазмид с протяженными инвертированными повторами. Такие повторы могут занимать до 80 % контурной длины плазмиды (например pSM22095). Клетки *B. subtilis* трансформируются плазмидами данного типа в мономерной форме с такой же эффективностью, как и суммарным препаратом плазмиды. А. И. Степанов с сотрудниками (1982 г.) предложили модель, объясняющую этот факт (см. рис. 10.3, *7*). Важно подчеркнуть, что делеции в природных плазмидах стрептококков, уменьшающие размер инвертированных повторов, часто не снижают эффективности трансформации ими клеток *B. subtilis*. Это наблюдение использовали сотрудники лаборатории Степанова при создании вектора ΔpSM19035 и клонировании в его составе рибофлавинового оперона *B. subtilis* (рис. 10.8). Показано, что у данной плазмиды мономерная форма эффективно трансформирует компетентные клетки *B. subtilis*, и поэтому ее с успехом можно использовать для клонирования экзогенных фрагментов ДНК по упрощенной экспериментальной схеме — трансформируя препаратом ДНК, полученным после лигазной реакции, компетентные клетки *B. subtilis*, а не протопласты.

10.2.2. Векторы на основе плазмид *Bacillus*

Параллельно с развитием векторной системы *Bacillus* на основе стафилококковых и стрептококковых плазмид велась разработка клонирующих векторов и на основе плазмид, выделенных из разных видов бацилл (табл. 10.4).

К. Бернхард с соавторами (1978 г.) показали, что плазмида pBC16 из *B. cereus* способна реплицироваться и детерминировать устойчивость к тетрациклину в клетках *B. subtilis*. После гидролиза pBC16 рестриктазой *Eco*RI и обработки ДНК-лигазой получена плазмида pBC16-1 (рис. 10.9), реплицирующаяся в клетках *B. subtilis* и сохранившая ген *tet*. Далее pBC16-1 была рекомбинирована *in vitro* по *Eco*RI-участку с криптической плазмидой *B. subtilis* pBS1. Однако в *B. subtilis* гибридная плазмида, состоящая из двух репликонов, оказалась нестабильной и диссоциировала на pBS161 и pBS162. Плазмиду pBS161 гидролизовали рестриктазой

Таблица 10.4. **Плазмиды бактерий рода *Bacillus*, использованные для создания клонирующих векторов *B. subtilis***

Плазмида	Источник выделения	Размер, тпн	Фенотипические маркеры
pBC16	*B. cereus*	4,5	Tc^r
pPL10	*B. pumilus*	6,6	Kil^+
pAB124	*B. stearothermophilus*	4,4	Tc^r
pLS28	*B. subtilis*	6,2	—
pBS1	*B. subtilis*	8,3	—
pTB19	Термофильная бактерия рода *Bacillus* штамм TR123	25,8	Nm^r, Tc^r

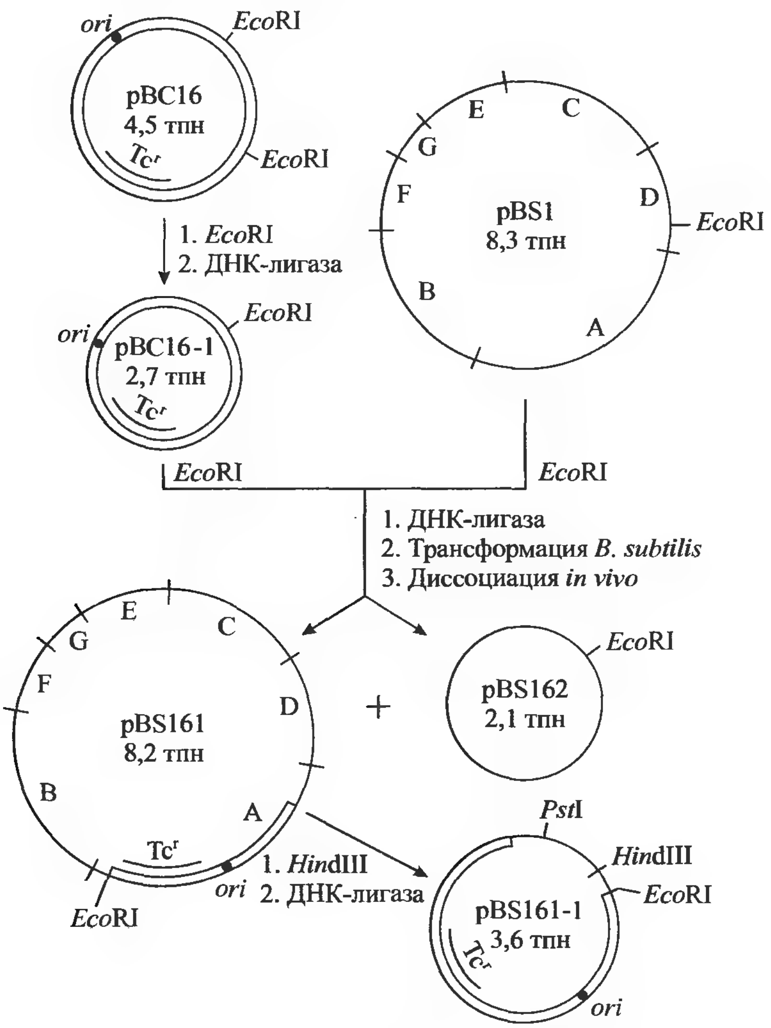


Рис. 10.9. Схема создания плазмиды pBS161-1.
A–G — *Hin*dIII-фрагменты плазмид в порядке уменьшения размера

*Hin*dIII и фрагменты циклизовали с помощью ДНК-лигазы. После трансформации клеток *B. subtilis* в устойчивых к тетрациклину клонах выявили новую плазмиду pBS161-1, которая представляла собой циклизованный *Hin*dIII-A-фрагмент pBS161. Полученная плазмида имеет единичные участки гидролиза рестриктазами *Eco*RI, *Hin*dIII, *Pst*I, встройки по которым не повреждают репликатор и ген *tet*. Это позволяет применять ее в качестве клонирующего вектора. Недостаток pBS161-1 — сложность отбора создаваемых на ее основе гибридных плазмид.

К. Нагахари и К. Сакагучи (1978 г.), используя плазмиду pRSF2124, проклонировали в *E. coli* гены *leu*A, B, C *B. subtilis* и показали, что гибридная плазмида pRSF2124-B.leu способна трансформировать к прототрофности мутанты *leu*⁻ как *E. coli*, так и *B. subtilis*. Однако реплицируется она только в *E. coli*, но не в *B. subtilis*. Поэтому *Eco*RI-фрагмент хромосомной ДНК из pRSF2124-B.leu перестроили в криптическую плазмиду pLS28 и после трансформации клеток *B. subtilis leu⁻ rec*E4 отобрали Leu^+-трансформанты, содержащие плазмиду pLS103. При встройке чужеродной ДНК по единственному участку *Bam*HI инактивируется ген *leu*A, но гены *leu*B и *leu*C сохраняют нативность. Ген *leu*C можно использовать в качестве маркера плазмиды pLS103.

На основе pLS103 гидролизом *in vitro* в условиях, изменяющих специфичность *Eco*RI на *Eco*RI*, получен делеционный вариант pLL10 (рис. 10.10). Данная плазмида уже имела один *Eco*RI-участок и содержала гены *leu*A, E (ген *leu*C делетирован). В pLL10 встроили предварительно клонированный в составе pBR322 *Eco*RI-фрагмент, несущий ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) *B. subtilis*, который обеспечивает устойчивость клеток к триметоприму. В результате получили плазмиду pTL10, трансформировавшую клетки *B. subtilis leu*A8 к фенотипу Leu^+Tp^r.

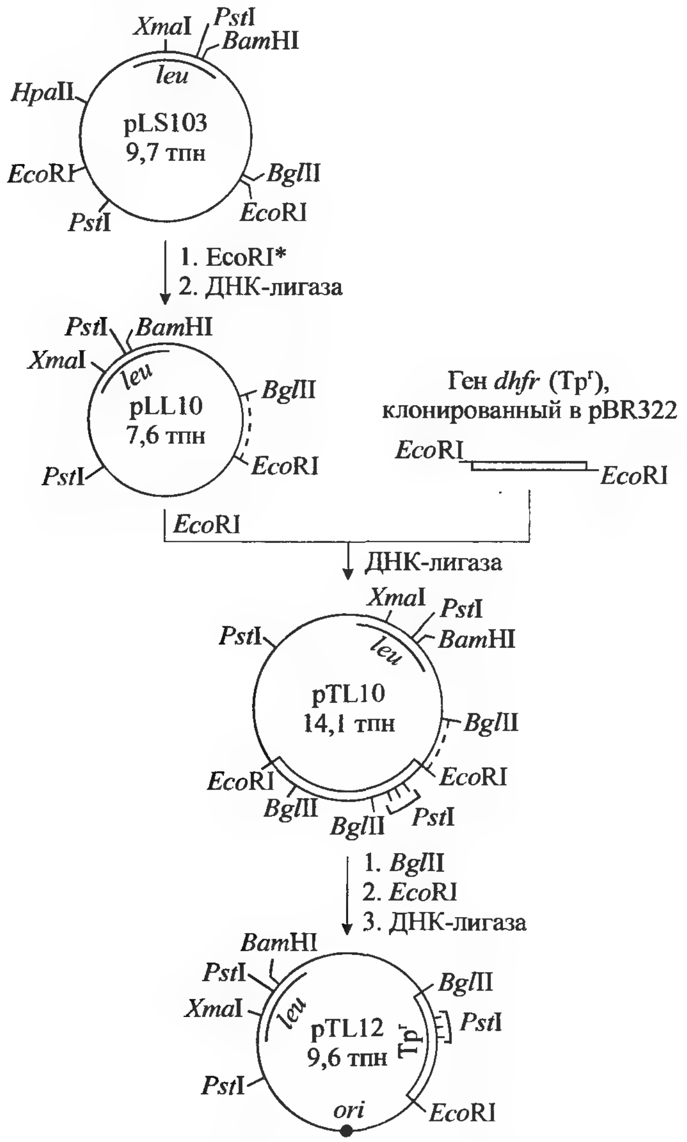


Рис. 10.10. Схема конструирования гибридных плазмид pTL10 и pTL12

Для уменьшения размера плазмиды и удаления некоторых рестрикционных участков pPL10 последовательно гидролизовали рестриктазами *Bgl*II, *Eco*RI и обрабатывали ДНК-лигазой. В результате этих манипуляций создали плазмиду pTL12 (см. рис. 10.10), имеющую единичные участки действия рестриктаз *Eco*RI, *Bgl*II, *Bam*HI и *Xma*I. При встройке фрагментов ДНК по участкам *Bam*HI и *Xma*I инактивируется маркер *leu* pTL12, и отбор трансформантов можно осуществлять по маркеру Tp^r.

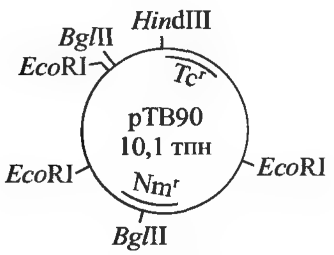


Рис. 10.11. Рестрикционная карта плазмиды pTB90

Плазмида *B. stearothermophilus* pAB124 также может быть использована в качестве клонирующего вектора *B. subtilis*, поскольку ее *Eco*RI-А-фрагмент содержит репликатор и ген *tet* и после циклизации с помощью ДНК-лигазы может функционировать в клетках *B. subtilis* как автономная кольцевая ДНК.

В термофильных бациллах выявлены плазмиды, обеспечивающие устойчивость клеток к различным антибиотикам. На основе одной из них — pTB19 — сконструировали *in vitro* делеционные варианты, в том числе pTB90 (рис. 10.11), ставший популярным вектором, пригодным для клонирования генов как в *B. subtilis*, так и в термофильной *B. stearothermophilus*.

Плазмиды *Bacillus* находят достаточно широкое применение при создании молекулярных

векторов *B. subtilis*. Это, в частности, обусловлено тем, что в ряде случаев такие плазмиды могут более стабильно по сравнению с «чужеродными» поддерживаться в клетках разных видов бацилл.

10.2.3. Векторные плазмиды, реплицирующиеся в *B. subtilis* и в *E. coli*

Система плазмидной трансформации клеток *E. coli* значительно проще, чем у *B. subtilis*. Кроме того, имеется большое число хорошо изученных плазмидных векторов *E. coli*. Поэтому несомненный интерес представляют гибридные плазмиды, которые могли бы реплицироваться как в *B. subtilis*, так и в *E. coli*. Такие плазмиды называют челночными.

Чужеродные гены первоначально можно клонировать в методически более простой системе *E. coli*, а затем отобранные двурепликонные гибридные плазмиды переносить в клетки *B. subtilis*. Перенос облегчается тем, что в препарате плазмиды, выделенном из клеток *E. coli*, содержатся мультимерные формы. Наличие в таких челночных векторах последовательностей плазмид *E. coli* дает возможность значительно увеличить спектр рестриктаз, по сайтам узнавания которых можно клонировать фрагменты ДНК. Более того, используя двурепликонные векторы, можно изучать функционирование одной и той же генетической конструкции в бактериальных клетках различных типов.

Уже в одной из первых работ (1978 г.) по получению плазмидных векторов *B. subtilis* С. Эрлих сконструировал гибридные плазмиды pHV12, pHV14 и pHV16, которые состояли из полных копий двух плазмид, гидролизованных *Hin*dIII: pC194 (Cm^r) и pBR313, pBR322 (Ap^r Tc^r) или pWL7 (Ap^rNm^r). Плазмиды pHV12, pHV14 и pHV16 реплицировались в клетках *E. coli* и *B. subtilis*. При этом в *E. coli* экспрессировались все нативные гены устойчивости к антибиотикам гибридных плазмид, а в *B. subtilis* — только ген *cat* (Cm^r) плазмиды pC194.

Аналогично Дж. Крэфт с соавторами (1978 г.) получили челночные плазмиды на основе репликона pBS161 и гидролизованных рестриктазой *Hin*dIII плазмид pBR322, pWL7 и pACYC184. Созданные гибридные плазмиды отличались структурной нестабильностью в *B. subtilis*, в то время как в *E. coli* они сохранялись достаточно стабильно (см. 10.4).

Другие исследователи с помощью ДНК-лигазы объединили гидролизованные *Eco*RI моле-

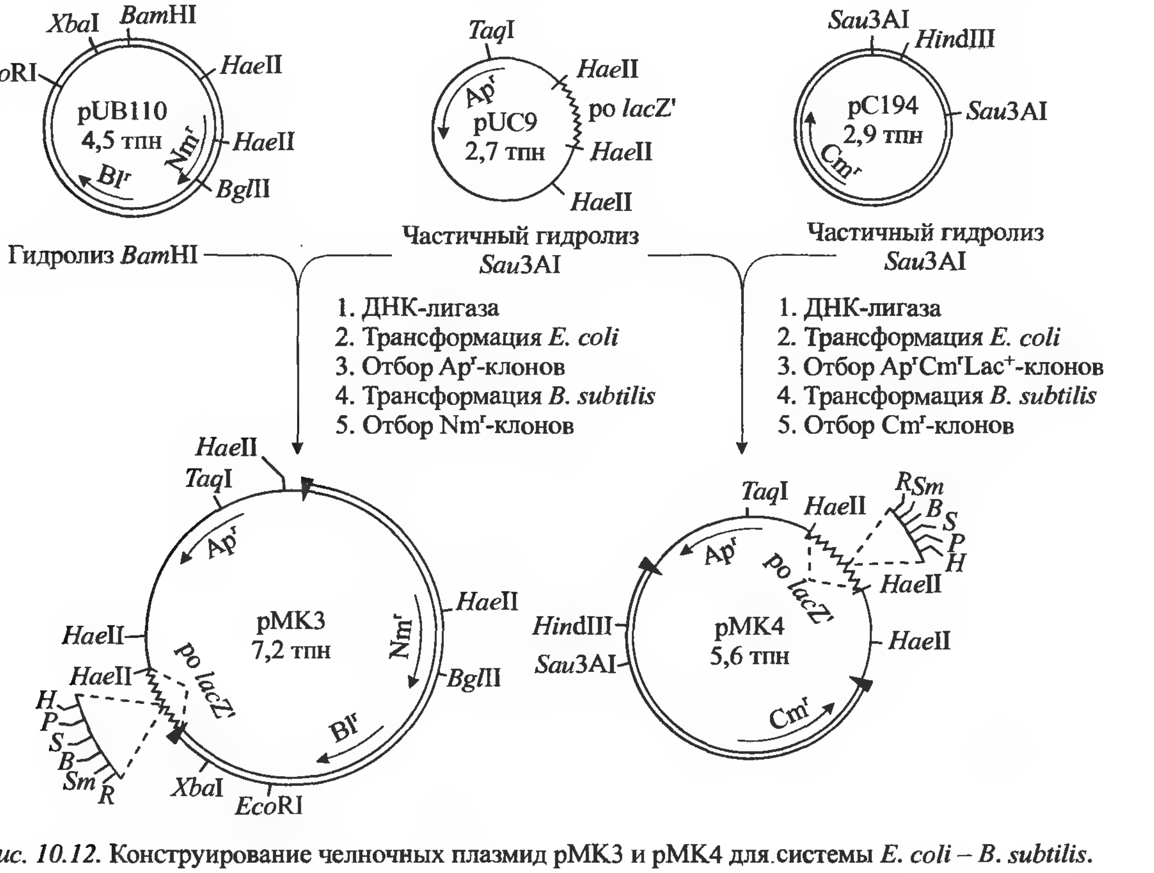


Рис. 10.12. Конструирование челночных плазмид pMK3 и pMK4 для системы *E. coli – B. subtilis*.

В полилинкере обозначены участки узнавания рестриктаз:
R — *Eco*RI, *Sm* — *Sma*I, *B* — *Bam*HI, *S* — *Sal*I, *P* — *Pst*I, *H* — *Hin*dIII

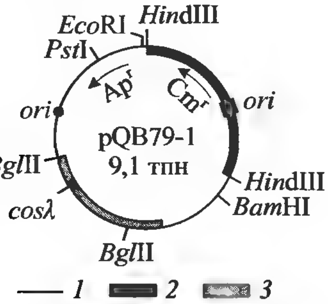


Рис. 10.13. Карта челночной космиды:

1 — последовательность ДНК pBR322, *2* — pC194, *3* — фага λ

кулы плазмиды pBS161-1 и репликативной формы ДНК фага M13mp2. Полученная гибридная плазмида pKJB200 реплицировалась как в *E. coli*, так и в *B. subtilis*, обеспечивая устойчивость их к тетрациклину. В *E. coli* при этом формировался жизнеспособный гибридный фаг M13. Данный челночный вектор имеет единичные участки рестрикции *Hin*dIII и *Pst*I.

Удобны челночные векторы pMK3 и pMK4, сконструированные М. Сулливаном с соавторами (1984 г.) на основе плазмид pUC9 и pUB110 или pC194 соответственно (рис. 10.12). Встройка фрагментов по многочисленным рестрикционным участкам полилинкера в гене *lacZ'* легко выявляется в клетках *E. coli*. Отобранные в *E. coli* гибридные молекулы затем можно вводить в клетки *B. subtilis*.

Важное значение для получения и характеризации ряда библиотек генов могут иметь двурепликонные векторы, созданные на основе плазмид *B. subtilis* и космид *E. coli*. Такой вектор сконструирован объединением плазмиды pC194 и космиды pHC79 по *Hin*dIII-участку. Полученная гибридная космида pQB79-1 (рис. 10.13) способна реплицироваться и в *B. subtilis*, и в *E. coli*. С помощью pQB79-1 в клетках *E. coli* клонированы *Eco*RI-фрагменты ДНК *B. subtilis* размером от 10 до 40 тпн. Затем гибридные космиды использовали для трансформации ауксотрофных мутантов *B. subtilis*. В результате были локализованы фрагменты ДНК, комплементирующие мутации по разным генам *B. subtilis*.

На основе репликонов плазмид pUB110, pBR350 и структурной части гена *cat* транспозона *E. coli* Tn*9* была создана плазмида pGR71 для отбора промоторсодержащих фрагментов ДНК. Она способна реплицироваться в клетках *B. subtilis* и *E. coli*. Это позволяет изучать функционирование клонированных промоторных фрагментов в обоих типах бактериальных клеток.

Кроме промоторов с помощью определенных векторов можно клонировать репликаторные последовательности ДНК. Так, используя гибридную плазмиду pCs540, не способную реплицироваться в клетках *B. subtilis*, но реплицирующуюся в *E. coli*, Л. Андерсону с соавторами (1982 г.) удалось клонировать фрагменты ДНК, обеспечивающие внехромосомную репликацию плазмиды в *B. subtilis recE*. Плазмида pCs540 состоит из *Hpa*II-фрагмента плазмиды *E. coli* pSC101 и детерминанты хлорамфениколацетилтрансферазы pC194. Ген *cat* экспрессируется в *E. coli* и в *B. subtilis*. При введении в клетки *B. subtilis* плазмида pCs540 не реплицируется, поэтому не удается получить клоны клеток с фенотипом Cm^r. Такие клоны получаются только в том случае, когда в плазмиду встроен фрагмент ДНК, обладающий функциями репликатора в *B. subtilis*. Данный подход по существу аналогичен методу отбора *ARS*-последовательностей в клетках дрожжей-сахаромицетов (см. 12.4.2).

По рассмотренным схемам получено большое число векторных двурепликонных плазмид. Многие из них с успехом используют в различных генно-инженерных экспериментах.

10.2.4. Векторная система секреции чужеродных белков из клеток *Bacillus*

Одно из самых важных направлений генно-инженерных исследований на *B. subtilis* и других бациллах — создание штаммов, секретирующих чужеродные белки из клеток. Бактерии рода *Bacillus* могут выделять во внешнюю среду различные белки. Хорошо изучена секреция α-амилазы, пенициллиназы и протеаз. Секретируемые белки имеют на N-конце сигнальный пептид, который отщепляется в процессе секреции, давая начало зрелой форме внеклеточного белка (см. 2.2.10). У изученных секретируемых белков *Bacillus* сигнальные пептиды необычно длинны (29–34 АК) в отличие от встречающихся в грамотрицательных бактериях и клетках животных (15–25 АК).

Клонируя гены секретируемых белков и удаляя затем кодирующую последовательность зрелой формы, можно создать молекулярные векторы экспрессии–секреции для грамположительных бактерий рода *Bacillus*. В первую очередь данный подход был реализован применительно к гену *amyE*. Этот ген кодирует α-амилазу — один из наиболее изученных и имеющих практическое значение секретируемых ферментов многих штаммов бацилл. Бактери-

альная α-амилаза используется в промышленном расщеплении крахмала до низкомолекулярных легко усваиваемых дрожжами продуктов (α-мальтозы, α-глюкозы и коротких α-декстринов), которые необходимы для таких микробиологических процессов, как, например, производство этанола. Выявлено не менее шести генов, участвующих в регуляции продукции этого фермента. Кропотливая многоступенчатая селекция позволила создать множество мутантных штаммов *Bacillus*, наиболее продуктивные из которых превосходят штаммы дикого типа по уровню синтеза α-амилазы в 10^3 раз. С развитием методов генно-инженерной реконструкции на системе *B. subtilis* возникла идея получения нового поколения продуцентов α-амилаз. При этом для промышленности (как, впрочем, и для фундаментальной науки) большой интерес представляли термостабильные формы данного фермента, гены которых можно было извлекать из ДНК термофилов и вводить в определенное генетическое окружение такого хорошо изученного мезофила, как *B. subtilis*.

В ряде лабораторий в векторных плазмидах *B. subtilis* были клонированы гены α-амилаз из *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* и др. Показано, что клонированные гены в составе многокопийных плазмид обеспечивают в *B. subtilis* многократно повышенный синтез и секрецию α-амилаз в среду. Уровень продукции и секреции фермента, детерминируемый клонированным геном *amy*E, столь высок, что на него практически не влияют различные мутации по регуляторным генам клетки-хозяина. Учитывая это, решено было создать вектор экспрессии секреции на основе элементов гена *amy*E.

И. Палва с соавторами в 1982 г. из гибридной плазмиды pKTH10 (рис. 10.14) с помощью рестриктазы *Eco*RI делетировали фрагмент ДНК, включающий в себя 3′-концевую часть структурного гена α-амилазы, и определили нуклеотидную последовательность *Mbo*I–*Eco*RI-фрагмента полученной плазмиды pKTH29. Оказалось, что *Eco*RI-участок удален на 192 пн от границы между областями, кодирующими сигнальный пептид и зрелую форму α-амилазы. В результате ряда манипуляций *in vitro* удалось получить плазмиду pKTH38, в которой *Eco*RI-сайт отстоял от указанной точки уже на 90 пн. Для создания экспрессирующего и секретирующего вектора необходимо было изменить клонированный фрагмент таким образом, чтобы сразу после последовательности, кодирующей сигнальный пептид α-амилазы, находился участок узнавания какой-либо рестриктазы. Для этого плазмиду pKTH38 расщепили рестриктазой *Eco*RI и гидролизовали с концов нуклеазой Bal31. К укороченным линейным молекулам плазмиды пришивали с помощью ДНК-лигазы *Hin*dIII-линкер и после циклизации плазмидных ДНК трансформировали ими *B. subtilis*. Анализ последовательности нуклеотидов ряда полученных плазмид позволил отобрать варианты с различной локализацией *Hin*dIII-участка в 5′-концевом сегменте гена α-амилазы (рис. 10.15). На основе pKTH51 сконструировали вектор pKTH114, в который встроен синтетический сегмент ДНК, содержащий во всех трех рамках трансляции стоп-триплеты. Такой вектор необходим для клонирования кодирующих последовательностей, не имеющих стоп-триплетов.

Созданные плазмиды были успешно использованы в качестве клонирующих векторов, обеспечивающих не только эффективную экспрессию чужеродных генов, но и секрецию синтезируемых чужеродных белков из клеток *B. subtilis* в окружающую среду. В частности, И. Палва с соавторами продемонстрировали, что встройка структурной части гена зрелой формы β-лактамазы *E. coli* в векторные плазмиды pKTH51, pKTH53 и pKTH84 приводит к эффективному синтезу и секреции ферментативно активной β-лактамазы. Подробный анализ продуктов секреции из клеток *B. subtilis* показал (рис. 10.16), что специфичность отщепления сигнального пептида зависит от использованного вектора и не может быть точно предсказана исходя из аминокислотной последовательности синтезируемого химерного пре-белка. Поэтому предпочтительнее при клонировании каждого целевого гена использовать набор векторов экспрессии–секреции и после создания гибридов выбирать вариант, дающий наилучший результат. Применяя векторы данного типа, удалось осуществить синтез и секрецию из клеток *B. subtilis* различных эукариотических белков, включая лейкоцитарный интерферон человека и фибробластный интерферон мыши.

Благодаря исследованиям, выполненным в разных лабораториях, стало очевидно, что кроме последовательности пре-белка важное значение для экспорта белка играют различные компоненты клетки, как мембранно-связанные, так и цитоплазматические, обеспечивающие узнавание сигналов секреции и направляющие белок через мембрану.

У *E. coli* целый ряд секретируемых белков являются белками внешней мембраны клетки,

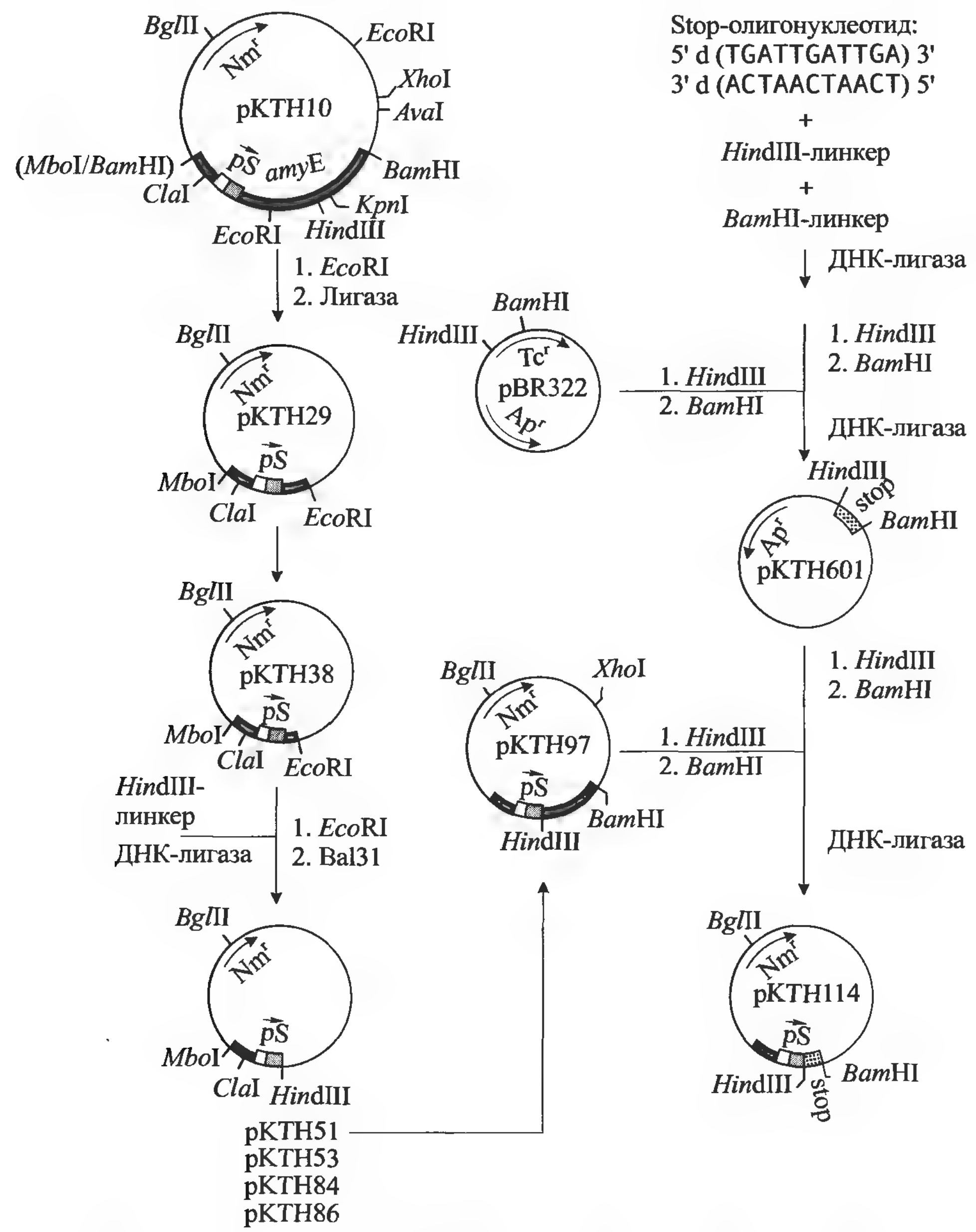


Рис. 10.14. Конструирование векторных плазмид экспрессии–секреции.
p — промотор, S — сигнальный пептид

у бацилл же такие белки отсутствуют. Это, возможно, привело к тому, что у грамположительных бактерий утрачен механизм процессинга подобных белков. Так, финские исследователи в 1986 г. показали, что белок внешней мембраны *E. coli* OmpA, состыкованный с сигнальным пептидом α-амилазы, не способен транслоцироваться через плазматическую мембрану *B. subtilis*. Обнаруженный факт может отражать пока не выясненные фундаментальные различия между белками внешней мембраны и другими типами экзобелков, а также между составом плазматических мембран грамотрицательных и грамположительных бактерий.

Перспективным направлением является также поиск штаммов бацилл, которые обеспечивают более высокую продукцию экзобелка, ген которого встроен в вектор секреции. В частности, Н. Цукагоши с соавторами (1985 г.), встроив ген α-амилазы *B. stearothermophilus* в состав pUB110, показали, что в *B. brevis* продукция и секреция в среду α-амилазы в 100 раз выше, чем в *B. stearothermophilus*, и в 5 раз выше, чем в *B. subtilis*. Данный подход аналогичен скрининговому методу, реализуемому на грамотрицательных бактериях для достижения наибольшей продукции целевого белка (см. 9.2).

```
          -31 -30               -25                     -20                     -15                     -10
pKTH10    ATG AAT CAA AAA CGA AAG CGG ACA GTT TCG TTC AGA CTT GTG CTT ATG TGC ACG CTG TTA TTT GTC AGT

                   -5                  -1  +1                 +5                      +10                     +15
          TTG CCG ATT ACA AAA ACA TCA GCC GTA AAT GGC ACG CTG ATG CAG TAT TTT GAA TGG TAT ACG CCG AAC ...

                                   -2  -1  ↓
pKTH51    TTG CCG ATT ACA AAA ACA TCA GCC GCA AGC TTG C...

                                                   +3  +4 ↓
pKTH53    TTG CCG ATT ACA AAA ACA TCA GCC GTA AAT GGC ACG CAA GCT TGC ...

                                                                                                 +13 +14  ↓
pKTH84    TTG CCG ATT ACA AAA ACA TCA GCC GTA AAT GGC ACG CTG ATG CAG TAT TTT GAA TGG TAT ACG CCG CAA GCT TGC ...

          -8  -7  ↓
pKTH86    TTG CCG CAA GCT TGC ...
```

Рис. 10.15. Нуклеотидная последовательность 5′-концевой части структурного гена α-амилазы *B. amyloliquefaciens* (pKTH10) и мест стыковки *Hin*dIII-линкера (подчеркнут) с делеционными производными pKT38.

Триплеты от –31 до –1 кодируют сигнальный пептид. Стрелкой обозначен участок гидролиза цепи ДНК рестриктазой *Hin*dIII

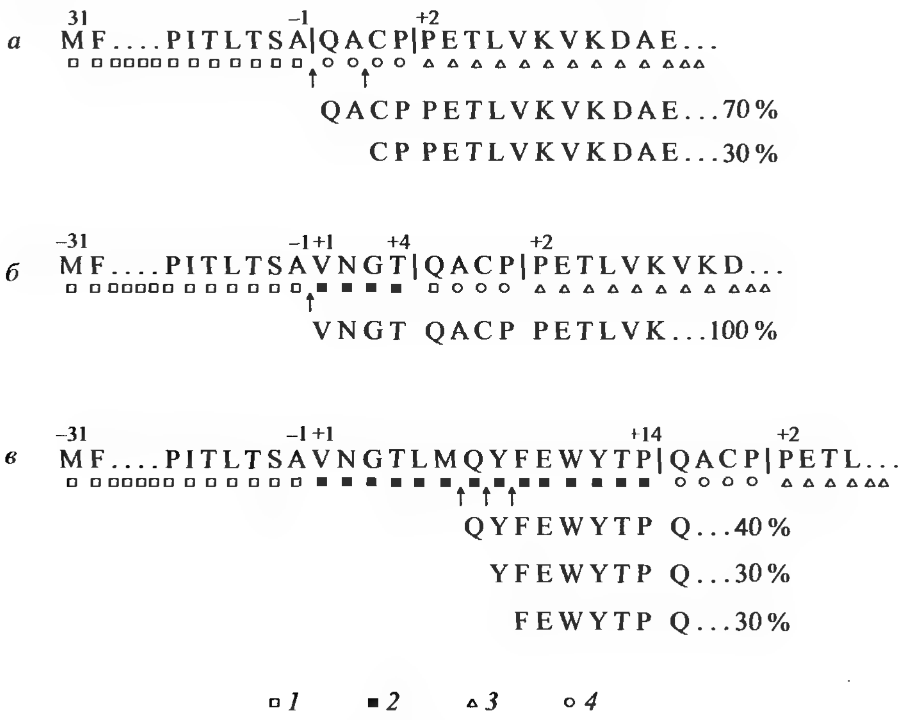


Рис. 10.16. Процессинг химерных белков при продукции внеклеточной β-лактамазы плазмидосодержащими клетками *B. subtilis*:

а — встройка структурного гена зрелой формы β-лактамазы в вектор pKTH51, *б* — pKTH53, *в* — pKTH84 (см. рис. 10.15); *1* — аминокислотная последовательность сигнального пептида α-амилазы, *2* — структурной части α-амилазы, *3* — β-лактамазы; *4* — аминокислоты, кодируемые линкером. Стрелками обозначены места отщепления сигнального пептида, цифрами — номера аминокислот («+» в зрелой форме, «−» в сигнальном пептиде). Содержание конкретных продуктов процессинга указано в процентах

Максимальный выход секретируемых чужеродных белков в рассмотренной выше векторной системе достигается в середине экспоненциальной фазы роста культуры. Это обусловлено тем, что на позднем этапе экспоненциального роста в клетках *B. subtilis* индуцируется активный синтез внеклеточных протеаз. На ранних этапах культивирования протеаз в среде существенно меньше, но тем не менее они заметно снижают выход чужеродного белка. Поэтому при создании штаммов бацилл, продуцирующих чужеродный белок во внеклеточной форме, большое внимание уделяют получению и использованию мутантных штаммов с пониженной протеазной активностью. Следует отметить, что снижения активности клеточных протеаз можно добиться также правильным выбором состава питательной среды и условий культивирования гибридного штамма.

Среди внеклеточных протеаз клетки бацилл в наибольшем количестве продуцируют нейтральную металлопротеазу и щелочную сериновую протеазу. Делеция обоих хромосомных генов, кодирующих данные протеазы, не нарушает процесс спорообразования. Полагают, что эти ферменты выполняют роль внеклеточных «мусорщиков». Обращает на себя внимание, что клетки бацилл способны одновременно производить в большом количестве и секретировать во внешнюю среду не только протеазы, но и другие белки, например α-амилазу. Чужеродные белки, секретируемые клетками бацилл в этих же условиях, как правило, подвергаются интенсивной протеазной атаке.

С. Рэйд с соавторами (1986 г.) предположили, что если в *B. subtilis* ввести в составе многокопийной плазмиды ген чужеродной бактериальной протеазы, то после секреции она будет деградировать нормально экспортируемые данной клеткой белки, включая и эндогенные протеазы. Если в такую клетку ввести ген другого секретируемого белка, выделенный из той же бактерии, которая явилась донором протеазного гена, то вероятна ситуация, когда целевой белок будет интенсивно секретироваться и при этом сохранит устойчивость к «своей» протеазе. Это может привести к тому, что создаваемый штамм *B. subtilis* будет синтезировать в виде внеклеточных белков в основном лишь чужеродную протеазу и целевой белок, что существенно упростит процедуру его очистки. Клонирование генов α-амилазы и нейтральной про-

теазы промышленного изолята *Bacillus* BcI в составе разных совместимых векторных плазмид и последующее совмещение гибридных плазмид в одной клетке *B. subtilis* полностью подтвердили сделанное предположение. По-видимому, данный подход можно реализовать в *Bacillus* и для эукариотических генов, если правильно подобрать пару целевой белок – протеаза и встроить их гены в подходящие векторы экспрессии–секреции.

Значительный практический и теоретический интерес представляет пенициллиназа (β-лактамаза) *B. licheniformis* — основной секретируемый белок данных бактерий, кодируемый хромосомным геном *pen*P. Клонирование этого гена в составе различных молекулярных векторов позволило определить его нуклеотидную последовательность и выявить районы, регулирующие его транскрипцию и трансляцию. При помощи челночных векторных плазмид продемонстрирована экспрессия клонированного гена *pen*P *B. licheniformis* в клетках *E. coli*, *B. subtilis*, *B. stearothermophilus* и *B. licheniformis*. Во всех изученных видах бактерий наблюдалась секреция пенициллиназы.

Полученные экспериментальные данные указали на возможность использования регуляторных элементов гена *pen*P при конструировании гибридных генов, направляющих в клетках *Bacillus* синтез и секрецию чужеродных белков. Такие гибридные гены созданы *in vitro*; в составе векторных плазмид они детерминировали в *B. subtilis* синтез и секрецию различных белков, в том числе проинсулина человека.

B. amyloliquefaciens, используемый в промышленности, является эффективным продуцентом не только α-амилазы, но одновременно и внеклеточных щелочной и нейтральной протеаз. При этом продукция нейтральной протеазы может достигать 3–5 г/л. Такой высокий уровень синтеза внеклеточного фермента обусловил повышенный интерес исследователей к кодирующему его гену как к исходной генетической структуре, на базе которой можно создать высокоэффективные векторы экспрессии–секреции.

Эту идею с успехом реализовали М. Хонё с соавторами (1984–1986 гг.). Прежде всего в составе плазмиды pUB110 был клонирован фрагмент хромосомной ДНК *B. amyloliquefaciens*, содержащий ген нейтральной протеазы *npr*. Гибридная плазмида pNP150 направляла очень высокую продукцию внеклеточной нейтральной протеазы в клетках *B. subtilis*. Секвенирование гена *npr* показало, что данный белок синтезируется первоначально в виде предшественника, у которого на N-конце находится дополнительно 221 АК (зрелая форма состоит из 300 АК). Наличие такой протяженной N-концевой последовательности белка-предшественника указывает на то, что он является пре-белком, т. е. имеет концевой сигнальный пептид, необходимый для выведения из цитоплазмы пробелка, который затем процессируется до зрелой формы белка. Механизм такого процессинга пока не ясен, но, по-видимому, он общий для внеклеточных протеаз, так как и у щелочной протеазы *B. amyloliquefaciens* между сигнальным пептидом и зрелой формой фермента обнаружена последовательность из 75 АК. Попытки выделить пробелок не увенчались успехом. Это говорит о том, что он быстро и эффективно процессируется в зрелую форму внеклеточных протеаз. Возможно, протеаза в виде пробелка неактивна, и синтез ее в такой форме является защитным механизмом клетки от преждевременной атаки этим ферментом.

Чрезвычайный интерес вызывал вопрос о том, может ли пре-гопоследовательность протеазы (пре-пропептид) осуществлять секрецию и правильное отщепление чужеродных белков, состыкованных с ней в составе химерного белка. Для выяснения этой возможности была создана векторная плазмида pES150, имеющая сайт рестрикции *Sph*I, который точно отсекает 5′-концевую часть гена *npr*, содержащую промотор, сигналы инициации трансляции и ген-эквивалент N-концевого пре-пропептида. В правильной рамке трансляции с векторной частью гена *npr* в плазмиде pES150 состыковали кодирующие последовательности зрелых форм α-амилазы *B. subtilis* или фибробластного интерферона человека. Созданные гибридные плазмиды ввели в клетки *B. subtilis* и обнаружили эффективную продукцию внеклеточных α-амилазы и интерферона, проявляющих характерную активность. При этом β-интерферон человека продуцировался на уровне 10^9 е. а./л. Встройка в pES150 структурной части гена зрелой формы гормона роста человека также приводила к секреции из *B. subtilis* биологически активного гормона роста. Таким образом, пре-пропептид нейтральной протеазы способен эффективно выполнять функцию переноса чужеродных аминокислотных последовательностей из клеток бацилл в окружающую среду.

Проведенные в других лабораториях исследования показали, что векторы экспрессии–секреции бацилл можно создавать на основе генов

внеклеточных протеаз по классической схеме, т. е. планируя встройку чужеродных последовательностей сразу после ген-эквивалента сигнального пептида (пре-пептида). При этом К. Ешимура с соавторами (1986 г.) обнаружили, что пенициллиназа *B. licheniformis* при стыковке с сигнальным пептидом нейтральной протеазы продуцируется клетками *B. subtilis* во внеклеточной форме до уровня 140 мг/л, в то время как пре-пропептид данной протеазы обеспечивал синтез лишь 1 мг/л внеклеточной пенициллиназы. По-видимому, с практической точки зрения перспективнее использовать «упрощенные» векторы секреции на основе генов внеклеточных протеаз. Н. Васанта и Л. Томпсон (1986 г.) показали, что такие векторы можно создавать на основе генов как нейтральной, так и щелочной протеаз.

Для синтеза чужеродных белков большое значение имеют векторы экспрессии, обеспечивающие регулируемое включение транскрипции клонированного в их составе гена. При создании векторов *Bacillus* с индуцируемой секрецией чужеродных белков внимание исследователей привлек ген левансахаразы. Левансахараза, кодируемая геном *sac*B *B. subtilis*, синтезируется после индукции сахарозой и секретируется из бактериальных клеток в больших количествах. В отсутствие сахарозы продукция левансахаразы не обнаруживается. При использовании сахарозы в качестве субстрата данный фермент катализирует две основные реакции: гидролиз сахарозы на глюкозу и фруктозу и полимеризацию фруктозильных остатков в гомополисахарид леван. Французские ученые в 1985 г. клонировали и секвенировали ген левансахаразы, а в 1988 г. описали векторную плазмиду pAE205, обеспечивающую индуцируемый сахарозой синтез и секрецию чужеродных белков из клеток *B. subtilis*. Причем был сконструирован набор из трех вариантов плазмиды со сдвигом рамки трансляции, обеспечивающих встройку любой непрерывной кодирующей последовательности сразу после ген-эквивалента сигнального пептида левансахаразы и правильную экспрессию этой последовательности в одной из совпавших рамок трансляции. На примере гена β-лактамазы *E. coli* была продемонстрирована эффективность разработанной векторной системы индуцибельной секреции белков из клеток грамположительной бактерии *B. subtilis*.

Для изучения разнообразия и эффективности сигнальных пептидов X. Смит с соавторами (1987 г.) создали два плазмидных вектора, предназначенных для селекции ген-эквивалентов сигнальных пептидов. Эти векторы представляют собой челночные плазмиды, способные реплицироваться в *E. coli* и в *B. subtilis*. Кроме гена устойчивости к эритромицину плазмиды содержат последовательность, кодирующую зрелую форму тестового фермента — α-амилазы *B. licheniformis* (pGPA11) либо β-лактамазы *E. coli* (pGPB11). Перед тест-последовательностью находится полилинкер, имеющий сайты узнавания для нескольких рестриктаз, что обеспечивает возможность встройки в данное место фрагментов ДНК, генерированных разными рестриктазами. Суть процедуры отбора состоит в следующем. β-Лактамаза способна придавать бактериям устойчивость к ампициллину только в том случае, когда она секретируется из цитоплазмы. После статистической встройки фрагментов ДНК в состав pGPB11 осуществляют трансформацию *E. coli* и на агаризованной среде с определенной концентрацией ампициллина отбирают устойчивые к данному антибиотику клоны. Показано, что все селектированные в *E. coli* гибридные плазмиды обусловливают секрецию β-лактамазы и в клетках *B. subtilis*. Для плазмиды pGPA11, содержащей структурный ген α-амилазы, селекцию трансформантов проводят на агаризованной среде с крахмалом. По зонам гидролиза крахмала вокруг колоний также выявляют гибридные варианты, обеспечивающие секрецию тестового фермента.

Важно отметить, что фрагменты ДНК, встроенные в селектируемые гибридные варианты, должны содержать в правильной ориентации промотор, участок связывания рибосом и ген-эквивалент сигнального пептида, при этом последовательность тестового гена должна совпадать по рамке трансляции с сигнальным пептидом. Чтобы увеличить вероятность выполнения этих условий, необходимо использовать гидролизаты ДНК различными рестриктазами. Так, хромосомную ДНК *B. subtilis* расщепляли рестриктазами *Sau*3AI, *Alu*I, *Hae*III или *Rsa*I и встраивали фрагменты в сконструированные векторные плазмиды. После анализа нескольких тысяч трансформантов оказалось, что среди гибридных клонов с тестовым геном α-амилазы секретируемые варианты составляли 0,1–0,5 %, а среди клонов с фенотипом Ap^r — 0,02–0,1 %. Более того, разные вставки обусловливали различный уровень устойчивости к ампициллину и продуктивности по внеклеточной α-амилазе. Полученная коллекция гибридных плазмид дает богатую возможность структур-

но-функционального исследования клонированных фрагментов ДНК.

Широкий спектр созданных векторов экспрессии–секреции бацилл позволяет успешно конструировать бактериальные штаммы, продуцирующие во внеклеточной форме эукариотические белки. Однако данная векторная система, по-видимому, имеет определенные ограничения для крупных белков, которые хотя и способны проходить через плазматическую мембрану, но не могут выйти из клетки в окружающую среду, т. е. «застревают» в клеточной стенке. В частности, сывороточный альбумин человека (зрелая форма состоит из 585 АК, что соответствует молекулярной массе 68 кДа), состыкованный в векторах секреции с сигнальным пептидом α-амилазы или нейтральной протеазы *B. amyloliquefaciens*, процессируется при секреции через плазматическую мембрану, но лишь следовые количества его зрелой формы выходят в окружающую среду. Эффективный экспорт данного белка наблюдается только в системе протопластов *B. subtilis*. По-видимому, такие крупные эукариотические белки могут эффективно секретироваться лишь в гомологичной векторной системе.

Следует особо подчеркнуть, что создаваемые штаммы бацилл, эффективно секретирующие во внешнюю среду целевые чужеродные белки, чрезвычайно перспективны для микробиологических процессов на основе иммобилизованных клеток. Так, уже первая работа в данном направлении показала, что иммобилизованные в агарозных гранулах клетки *B. subtilis*, содержащие гибридную плазмиду pPCB6, в которой регуляторная область гена пенициллиназы *B. licheniformis* состыкована с геном препроинсулина, способны продуцировать и секретировать в среду крысиный проинсулин, по крайней мере, в течение нескольких суток.

Дальнейшее развитие исследований по конструированию штаммов *Bacillus*, секретирующих чужеродные белки в среду, позволит глубже понять закономерности транспорта белков через плазматическую мембрану, а следовательно, создать высокоэффективные технологические процессы микробиологического синтеза белков человека и животных.

10.2.5. Плазмидные интегративные векторы

Гены, клонированные в составе плазмид, как правило, присутствуют в клетке-реципиенте в нескольких копиях. Увеличенная доза гена обусловливает повышенную продукцию кодируемого им белка. В некоторых случаях суперпродукция чужеродных белков в плазмидосодержащих клетках вызывает токсический эффект, следствием чего является нестабильность гибридных плазмид, т. е. селективное преимущество имеют клетки, утратившие плазмиду или содержащие ее мутантные формы. Кроме того, при промышленном культивировании бактерий, которое может протекать в течение длительного времени и сопровождаться большим числом клеточных делений в отсутствие селективного давления по маркерам плазмид, часто возникают проблемы с поддержанием гибридных внехромосомных молекул ДНК, хотя явное отрицательное воздействие на бактерию этих гибридных ДНК в лабораторном эксперименте не выявляется. Для преодоления возникающих затруднений предложен альтернативный подход, который состоит в интеграции целевых генов в хромосомную ДНК реципиентной клетки.

Встройку чужеродных генов в геном клетки осуществляют с помощью специализированных плазмид, называемых векторами интеграции. Классическим вектором данного типа является плазмида, не способная реплицироваться в исследуемых клетках, но имеющая в своем составе сегмент ДНК, гомологичный определенному району бактериальной хромосомы. Многочисленные эксперименты показали, что плазмиды интеграции способны с высокой эффективностью рекомбинационно встраиваться в геном *B. subtilis*. При этом интеграция является *rec*E-зависимой и в большинстве изученных случаев происходит по модели Кэмпбелла, т. е. кольцевая молекула ДНК рекомбинирует с гомологичным участком бактериальной хромосомы в одной точке (участке) и целиком встраивается в геном клетки.

Векторы рассматриваемого типа обычно содержат репликон, функционирующий в клетках *E. coli*, а также детерминанты устойчивости к антибиотикам, хотя бы одна из которых экспрессируется в *B. subtilis*. Интегративные трансформанты *B. subtilis* выявляют по функциям этих плазмидных детерминант. Используя интегративные векторы, можно любые чужеродные гены ковалентно встраивать в геном бактериальной клетки.

Доказано, что в процессе интеграции плазмид в геном *B. subtilis* может происходить тандемная дупликация встраиваемых последовательностей. Аналогичное явление обнаружено и при интеграции экзогенной ДНК в геном клеток дрожжей и высших эукариот (см. 12.4.1, 13.3.1). Эти результаты демонстрируют боль-

шое сходство рекомбинационних процессов в прокариотах и эукариотах, что указывает на древнее происхождение данных ферментных систем.

«Природная» дупликация и амплификация генов имеет место в бактериях, дрожжах, культивируемых клетках животных, вирусах, а также на определенных стадиях дифференцировки насекомых, амфибий и куриных эмбрионов. Амплификация протяженных последовательностей ДНК играет важную роль в ответе организма на изменение условий окружающей среды, в регулировании процессов дифференцировки. Вместе с тем значение явления дупликации, амплификации генов в эволюции организмов пока осознано не полностью.

Амплификация генов, по-видимому, широко распространена среди бактерий разных таксономических групп. Например, хромосомы *E. coli* и *B. subtilis* содержат множественные копии генов рибосомной РНК. Наиболее просто контролировать процесс амплификации удается при использовании генов устойчивости к антибиотикам. Так, многократное повторение хромосомных детерминант устойчивости к антибиотикам выявлено у различных штаммов бактерий рода *Streptomyces* при селекции вариантов, способных расти в присутствии повышенных концентраций антибиотиков. Для *E. coli* показано, что гибридная плазмида pBR322, несущая фрагмент хромосомной ДНК *E. coli*, может интегрироваться в геном бактериальной клетки в виде множества копий. А в процессе культивирования таких бактерий на среде с повышенной концентрацией ампициллина или тетрациклина происходит амплификация встроенной плазмиды в десятки раз.

М. Янг в 1984 г. показал, что после интеграции в геном *B. subtilis* гибридной плазмиды, несущей ген хлорамфениколацетилтрансферазы плазмиды pC194 *S. aureus*, можно добиться значительной амплификации интегрированной последовательности при культивировании трансформированных клеток на средах с постепенно повышающимися концентрациями хлорамфеникола. Рост в присутствии хлорамфеникола штамма *Proteus mirabilis*, содержащего R-плазмиду, обеспечивающую устойчивость к этому антибиотику, приводит к десятикратной амплификации r-детерминанты в составе плазмиды. Имеется и много других примеров экспериментальной амплификации генов прокариот.

В целом можно предположить, что в бактериях, как и в эукариотических клетках, с некоторой частотой спонтанно происходит амплификация различных районов хромосомной ДНК. При селективных условиях, позволяющих поддерживать амплифицированное состояние определенного гена, происходит отбор таких необычных вариантов бактерий.

Явление амплификации сегментов ДНК было подробно изучено у бактерий *B. subtilis* и использовано при создании штаммов-продуцентов, несущих чужеродные гены в составе бактериальной хромосомы. Х. Ямасаки с соавторами в 1986 г. показали, что амплифицируемые районы хромосомной ДНК бацилл могут иметь большой размер и не ограничиваться каким-либо определенным геном. Так, при изучении туникамицин-устойчивых мутантов *B. subtilis* выяснилось, что такая устойчивость возможна лишь после амплификации гена *tmr*B. Одновременно некоторые из изученных мутантов обеспечивали значительное увеличение продукции внеклеточной α-амилазы. Подробное исследование мутанта *tmr*A7 показало, что у него произошла амплификация сегмента ДНК размером 16 тпн, в состав которого входят гены *tmr*B и *amy*E. Таким образом, в данном случае наблюдали явление, получившее у эукариот название ***коамплификация*** (см. 14.1.3).

Эти же авторы в 1988 г. предложили элегантный способ направленной амплификации протяженных последовательностей хромосомной ДНК с одновременным введением чужеродной ДНК. На основе pBR327 они сконструировали гибридную плазмиду pKH81, несущую два коротких сегмента ДНК, ограничивающих район хромосомной ДНК *B. subtilis* размером 22 тпн, в состав которого входят гены туникамицин-устойчивости *tmr*B, α-амилазы *amy*E и шикиматкиназы *aro*I. После плазмидной трансформации и отбора клонов *B. subtilis* Tm^r было показано, что трансформанты имеют амплификацию изучаемого района 22 тпн и характеризуются повышенным уровнем продукции α-амилазы и шикиматкиназы. Амплификация достигала 10–20 копий. Таким образом, данная плазмида направляет амплификацию фрагментов хромосомной ДНК *B. subtilis*. При этом происходит интеграция и коамплификация последовательности, содержащейся в плазмиде между фрагментами хромосомной ДНК (рис. 10.17).

В результате внутримолекулярной рекомбинации тандемные повторы могут выщепляться. Поэтому амплифицированное состояние сегментов ДНК стабильно поддерживается лишь в условиях селективного давления по маркеру, обеспечившему отбор таких вариантов.

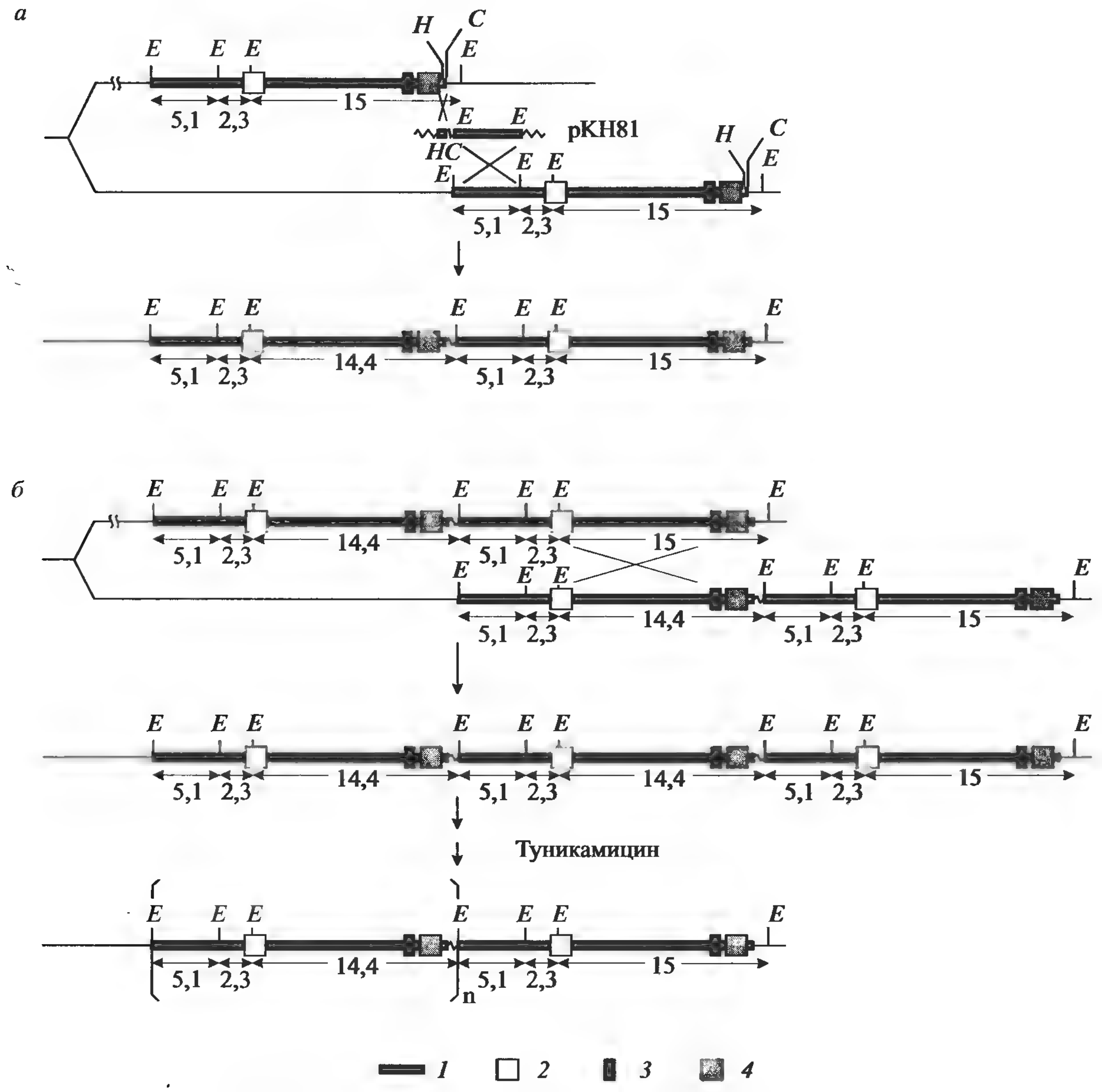


Рис. 10.17. Предполагаемый механизм трансформации плазмидой pKH81, приводящий к дупликации (*а*) и амплификации (*б*) генов *B. subtilis*:

1 — район хромосомной ДНК *B. subtilis* (22 тпн); *2* — ген α-амилазы, *3* — устойчивости к туникамицину, *4* — шикиматкиназы. Сайты рестрикции: *E* — *Eco*RI, *H* — *Hin*dIII, *C* — *Cla*I. Цифрами обозначены размеры субфрагментов в тыс. пар нуклеотидов

На примере гена *amy*E *B. amyloliquefaciens* И. Палва с соавторами (1987 г.) сравнили разные подходы к созданию штамма *B. subtilis*, характеризующегося суперпродукцией α-амилазы. На начальном этапе изучили два штамма-продуцента. Первый содержал плазмиду pKTH10 (см. рис. 10.14), а второй имел два гена, интегрированных в разные участки хромосомы. Его создавали путем трансформации *B. subtilis* смесью плазмид, несущих ген *amy*E и статистически встроенные сегменты хромосомной ДНК *B. subtilis*, которые получили частичным гидролизом рестриктазой *Sau*3AI. Поэтому встройка гена *amy*E за счет гомологичной рекомбинации происходила в самые разные места бактериального генома.

Сравнение данных штаммов по уровню синтеза внеклеточной α-амилазы дало неожиданный результат. Штамм, содержащий высококопийную плазмиду, по продуктивности фермента не превосходил штамм, имеющий всего лишь две копии гена *amy*E в составе своей хромосомы. Возможно, это обусловлено тем, что, хотя плазмидосодержащий штамм активнее продуцирует α-амилазу на ранних стадиях роста культуры, при переходе в стационарную фазу

ее синтез прекращается. В то же время штамм с интегрированными копиями гена *amy*E имеет более длительный период синтеза α-амилазы, и в итоге продукция целевого белка достигает такого же уровня. Полученные результаты позволяют сделать заключение, что при переходе к промышленному культивированию возможны варианты, когда бактериальный штамм, содержащий чужеродный ген в интегрированном в хромосому состоянии, будет иметь определенные преимущества перед штаммом, несущим многокопийную гибридную плазмиду.

Для того чтобы повысить продуктивность штамма с интегрированными копиями гена *amy*E, использовали два подхода к амплификации целевого гена. Первый был классическим и предусматривал последовательное культивирование штамма *B. subtilis* в присутствии повышающихся концентраций хлорамфеникола. В результате удалось отобрать вариант, у которого уже было не две, а девять копий гена *amy*E. Продуктивность по α-амилазе при этом повысилась в 8 раз. Второй подход был новым и состоял в том, что исследуемый штамм с двумя интегрированными генами *amy*E повторно трансформировали смесью плазмид интеграции, несущих ген *amy*E и сегменты ДНК *B. subtilis* из разных участков хромосомы. В результате был получен клон, содержащий 8 копий гена *amy*E, который обеспечивал шестикратное увеличение продукции α-амилазы. Последний вариант «рассеянной амплификации» целевого гена в хромосоме бактерии обеспечивает бóльшую стабильность штамма-суперпродуцента по сравнению с классическими штаммами, несущими тандемно повторенные амплифицированные гены, предрасположенные к выщеплению.

Несомненно интересен вопрос о том, будет ли сохраняться амплифицированное состояние определенного участка бактериальной хромосомы в неселективных условиях, если ввести в эти клетки мутации типа *rec*E4 (наличие такой мутации в исходном штамме препятствует амплификации). Если этот подход удастся реализовать, то система с амплификацией (и коамплификацией) генов станет весьма перспективной для конструирования стабильных штаммов — продуцентов различных белков на основе *B. subtilis*.

10.2.6. Фаговые векторы

B. subtilis является пермиссивным хозяином для большого числа фагов. Достаточно хорошо изучена молекулярно-биологическая организация таких фагов *B. subtilis*, как ϕ105, ϕ3T, ρ11, SPP1, SPO1 и некоторых других. Разработаны методы трансфекции молекул ДНК этих фагов как в протопласты, так и в компетентные клетки бацилл. Все это создало предпосылки для разработки векторной системы бацилл на основе ДНК бактериофагов. Данные исследования развиваются двумя путями: 1) использование умеренных фагов для интеграции чужеродной ДНК в профаг — ***профаговая трансформация***; 2) создание инфекционных клонирующих векторов.

Поскольку к началу генно-инженерных экспериментов фаги бацилл были изучены недостаточно, в первую очередь разработали и использовали метод профаговой трансформации. Одну из пионерских работ выполнили Ф. Кавамура с соавторами в 1979 г. ДНК умеренного фага ρ11 и хромосомную ДНК *B. subtilis* 168 расщепили рестриктазой *Eco*RI, смесь полученных фрагментов обработали ДНК-лигазой и таким препаратом трансформировали клетки *B. subtilis spo*A12 *lys*21 *his*A1 *leu*A8, лизогенные по фагу ρ11. На селективных средах отбирали клоны трансформантов с фенотипом Lys$^+$, His$^+$ или Leu$^+$. Затем в трансформантах каждого типа митомицином С индуцировали профаги и полученное фаговое потомство исследовали на способность образовывать бляшки на бактериальном газоне и трансдуцировать маркер, комплементирующий определенную ауксотрофную мутацию клетки-реципиента. В результате этих экспериментов были получены различные типы бляшкообразующих и дефектных фагов, которые трансдуцировали маркеры *his*A или *lys*.

Независимо аналогичную систему клонирования чужеродного гена применили в 1979 г. Ф. Янг с сотрудниками. ДНК фага ϕ3T и хромосомную ДНК *B. amyloliquefaciens* H гидролизовали рестриктазой *Bgl*II, смесь фрагментов обрабатывали лигазой. Полученный препарат использовали совместно с ДНК *B. subtilis thr*$^+$*amy*$^-$ в эксперименте по котрансформации клеток *B. subtilis thr*$^-$*amy*$^-$, лизогенных по фагу ϕ3T. Отбирали клоны трансформантов с фенотипом Thr$^+$, которые затем анализировали на продукцию α-амилазы (котрансформируемый неселективный признак). Из 10^5 трансформантов семь продуцировали α-амилазу, и в пяти отобранных двойных трансформантах Thr$^+$Amy$^+$ индуцировались фаги ϕ3T, которые трансдуцировали ген α-амилазы. Доказано, что в полученных Amy$^+$-лизогенах *B. subtilis* синтезируется

α-амилаза, специфичная для *B. amyloliquefaciens*.

Как видим, разработанный метод заключается в том, что любой чужеродный ген, ковалентно объединенный с фрагментами фаговой ДНК, может быть интегрирован *in vivo* в профаг. И в тех случаях, когда встройка не нарушает жизненно важные функции фага, после индукции профага можно получить фаговые частицы, трансдуцирующие чужеродный ген. Важной особенностью данного подхода является то, что продуктами лигазной реакции можно осуществлять прямую трансформацию компетентных клеток *B. subtilis*, что часто не удается сделать при использовании плазмидных клонирующих векторов. При этом фрагменты ДНК входят в клетки в одноцепочечной форме и интегрируются в хромосому по профагу (см. рис. 10.3, *1*). Данный метод относительно прост и позволяет в первую очередь создавать фаги, трансдуцирующие различные гены бацилл. Это обусловлено тем, что клонируемые гены проще выявлять в бактериальной клетке по комплементации определенных хромосомных мутаций. С помощью описанного подхода удалось получить фаги, трансдуцирующие такие гены *B. subtilis*, как *amy*E, *met*B, *lys*, многочисленные гены, регулирующие споруляцию, гены утилизации *D*-глюконата и др.

Дальнейшее развитие рассмотренный метод получил в работе Д. Саввэ и Дж. Мандельштама (1984 г.). Авторы клонировали в составе векторной плазмиды *E. coli* pUC9 (см. рис. 2.35) фрагмент *Eco*RI-E ДНК фага ϕ105. Внутри данного фрагмента находится *Hin*dIII-участок. Поэтому наработанный в *E. coli* в составе гибридной плазмиды фрагмент генома фага ϕ105 выщепляли с помощью рестриктазы *Eco*RI, гидролизовали его ферментом *Hin*dIII и к полученным фрагментам добавляли обработанный *Hin*dIII препарат чужеродной ДНК. После лигирования такой смеси с определенной частотой образовывались тройные фрагменты, в которых *Hin*dIII-фрагмент изучаемой ДНК фланкировался двумя *Hin*dIII–*Eco*RI-фрагментами ДНК фага ϕ105, что обеспечивало их эффективную интеграцию в профаг ϕ105. Причем чужеродная ДНК встраивалась в строго определенное место фагового генома, в отличие от предложенных ранее методов статистической интеграции в профаг. Такой вариант метода получения гибридных трансдуцирующих фагов более прост и надежен.

Профаговую трансформацию также можно осуществлять с помощью специальных векторов интеграции. Рассмотрим созданную Е. Феррари и Дж. Хоком (1982 г.) плазмиду такого типа — pFH7 (рис. 10.18). Данная челночная плазмида в своем составе содержит фрагмент ДНК умеренного бактериофага SPβ. При введении pFH7 в клетки *B. subtilis*, лизогенные по фагу SPβ, происходит интеграция плазмиды в профаг и клетки приобретают устойчивость к хлорамфениколу за счет экспрессии гена *cat* pC194. Индукция профага приводит к образованию инфекционного потомства фага SPβ, способного с высокой эффективностью трансдуцировать маркер устойчивости к хлорамфениколу. Любой чужеродный ген после встройки в плазмиду pFH7 можно интегрировать в профаг, а в результате индукции удается получить фаговое потомство, трансдуцирующее клонированный ген.

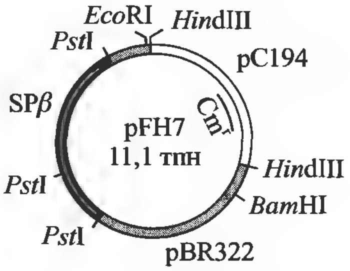


Рис. 10.18. Рестрикционная карта вектора интеграции *B. subtilis*

Для повышения эффективности профаговой трансформации клеток *B. subtilis* Х. Джениксон и М. Дэдмэн в 1984 г. создали вектор на основе дефектного (не формирующего бляшек на газоне чувствительных клеток) фага ϕ105d*lys*. В ДНК этого фага отсутствуют участки гидролиза рестриктазой *Bgl*II, а на плазмиде pBD64 имеется единственный сайт узнавания данного фермента. Препараты ДНК фага ϕ105d*lys* и плазмиды pBD64 обрабатывали рестриктазой *Hpa*II в условиях частичного гидролиза. Полученные статистические смеси фрагментов объединяли и ковалентно сшивали с помощью ДНК-лигазы. Продуктами лигирования трансформировали компетентные клетки *B. subtilis*, лизогенные по ϕ105d*lys*, и отбирали клоны трансформантов с фенотипом Cm^r. После индукции профага в одном из клонов выделен дефектный трансдуцирующий фаг ϕ105dCm^r. Оказалось, что в ДНК этого фага встроен фрагмент плазмиды pBD64, содержащий кроме гена *cat* и сайт рестриктазы *Bgl*II. Чтобы проверить, подходит ли этот участок для клонирования, по нему в ДНК ϕ105dCm^r встроили *Bgl*II-фрагменты генома *B. subtilis*, лигазной смесью трансформировали клетки *B. subtilis met*C3(ϕ105dCm^r) и отбирали клоны клеток,

имеющие фенотип $Met^{+}Cm^{r}$. После индукции в этих клетках профага митомицином и инфекции их фагом-помощником выделены фаги, трансдуцирующие одновременно гены *cat* и *met*C3. Следует отметить, что в данном случае чужеродные гены были фланкированы протяженными последовательностями фаговой ДНК, что должно увеличивать частоту интеграции в профаг. При этом встройка чужеродных генов происходила в строго заданный район фагового генома.

Разработка метода интеграции чужеродных генов в профаг явилась важным этапом в развитии генно-инженерной системы *B. subtilis*. Однако этот подход имеет и определенные недостатки. Один из них заключается в том, что для трансформации лизогенных клеток *B. subtilis* требуются относительно большие количества препарата ДНК, так как уровень трансформации таких клеток примерно в 100 раз ниже, чем нелизогенных. Дж. Эррингтон и Д. Джонс (1984–1987 гг.) на примере фага ϕ105 разработали более эффективный метод прямой встройки *in vitro* фрагментов ДНК в фаговый геном с последующей трансформацией протопластов *B. subtilis*. В геном мутантного фага ϕ105, имеющего протяженную (около 4 тпн) делецию в несущественной для его жизнедеятельности области, ввели уникальные участки гидролиза рестриктазами *Bam*HI и *Xba*I. Важная особенность полученных векторных фагов ϕ105J23, ϕ105J24 и др. состоит в том, что они являются термочувствительными мутантами по гену белка репрессора. Это позволяет при пермиссивной (низкой) температуре лизогенизировать клетки *B. subtilis* гибридными фагами, а при повышении температуры, сопровождающемся инактивацией репрессора, просто и эффективно индуцировать гибридные фаги из состояния профага. Так, после частичного гидролиза хромосомной ДНК *B. subtilis* рестриктазой *Mbo*I и встройки в вектор ϕ105J27 по сайту *Bam*HI полученных фрагментов размером 3–4 тпн удалось достаточно просто отобрать гибридные фаги, трансдуцирующие в мутантные клетки *B. subtilis* 23 различных локуса генетической системы, контролирующей споруляцию бацилл.

Клонирующие векторы созданы также на основе некоторых других фагов бацилл, не только умеренных, но и вирулентных. Как видим, векторная система клеток *B. subtilis* на основе ДНК фагов разработана относительно хорошо. Для малоизученных умеренных фагов бацилл предложен метод статистической интеграционной встройки чужеродных генов *in vivo* в соответствующий профаг. Индуцируя измененные в процессе такой интеграции профаги, получают гибридное фаговое потомство, которое в одних случаях может быть дефектным (размножается в присутствии фага-помощника), а в других — жизнеспособным. По-видимому, такой подход конструирования гибридных фагов применим и к малоизученным умеренным фагам *E. coli*.

10.3. ЭКСПРЕССИЯ ЧУЖЕРОДНЫХ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ *BACILLUS*

10.3.1. Особенности строения и экспрессии генов грамположительных бактерий

Начиная с самых первых генно-инженерных экспериментов на *B. subtilis*, было обнаружено, что гены различных грамположительных бактерий, как правило, экспрессируются в клетках данной бактерии. В то же время оказалось, что подавляющее большинство генов грамотрицательных бактерий, в том числе *E. coli*, не функционируют в *B. subtilis*, хотя гены бацилл, в свою очередь, экспрессируются в *E. coli*.

Поскольку генетический код универсален, полученные результаты могут указывать на различие регуляторных последовательностей нуклеиновых кислот, а следовательно, и на различие ферментных систем транскрипции и трансляции у грамположительных и грамотрицательных бактерий.

У грамположительных бактерий, как и у грамотрицательных, транскрипция осуществляется мультисубъединичным ферментом РНК-полимеразой, имеющим формулу $\beta\beta'\alpha_2\sigma$ (см. 3.2). σ-Фактор в этом комплексе определяет специфичность связывания кор-фермента РНК-полимеразы с промоторными участками на молекуле ДНК. В отличие от *E. coli* в клетках *B. subtilis* обнаружено большое разнообразие σ-факторов (табл. 10.5), которые обусловливают узнавание каждым типом холофермента специфичной промоторной последовательности на ДНК.

Необходимо отметить, что консервативные области промоторов *B. subtilis*, специфичных для основной формы РНК-полимеразы данной бактерии ($E\sigma^{43}$), и промоторов подавляющего большинства генов *E. coli*, узнаваемых ферментом $E\sigma^{70}$, совпадают. Однако данная форма РНК-полимеразы *B. subtilis* более чувствитель-

Таблица 10.5. **Специфичность σ-факторов РНК-полимеразы**

σ-Фактор	Примеры генов	Функции транскрибируемых генов	Консервативная последовательность промотора	
			Область –35	Область –10
Bacillus subtilis				
σ^{43}	*rpo*D, *sig*A	Поддержание жизнедеятельности	TTGACA	TATAAT
σ^{28}	*sig*D	Хемотаксис, синтез жгутиков	CTAAA	CCGATAT
σ^{29}	*spo*IIGB, *sig*E	Споруляция	TTN*AAA	CATATT
σ^{32}	*sig*C	Неизвестна	AAATC	TANTGNTTNTA
σ^{37}	*sig*B	Неизвестна	AGGNTT	GCNATTGNT
Escherichia coli				
σ^{70}	*rpo*D	Поддержание жизнедеятельности	TTGACA	TATAAT
σ^{32}	*htp*R, *rpo*H	Реакция на тепловой шок	CTTGAA	CCCCATNTA

* N — любой нуклеотид.

на к «нарушениям» консервативных областей промотора, чем аналогичный фермент *E. coli*. На эффективность функционирования промоторов в *B. subtilis* могут существенно влиять АТ-богатые последовательности, расположенные перед областью –35. Предполагают также, что существуют какие-то другие, еще достоверно не установленные, особенности строения промоторов грамположительных бактерий.

Многочисленные эксперименты доказывают, что РНК-полимераза Еσ^{43} *B. subtilis* имеет высокую специфичность к собственным промоторам и к промоторам других грамположительных бактерий, но с гораздо меньшей эффективностью узнает промоторы *E. coli* и других грамотрицательных бактерий. Так, например, Дж. Крефт с соавторами в 1983 г. обнаружили, что в *B. subtilis* не синтезируются продукты генов *bla* и *cat*, но экспрессируется ген *tet E. coli*. При этом гены *bla* и *cat E. coli* в клетках *B. subtilis* не транскрибируются. Анализ последовательностей промоторов этих трех генов *E. coli* показал (рис. 10.19), что лишь промотор гена *tet* имеет последовательности, высокогомологичные консервативным районам промоторов генов бацилл, узнаваемых полимеразой Еσ^{43}. Однако синтезируемая мРНК *tet* слабо вовлекается аппаратом *B. subtilis* в процесс трансляции, что обусловливает низкий уровень синтеза соответствующего белка *E. coli* в клетках бацилл.

Многочисленными исследованиями установлено, что жесткие ограничения на экспрессию чужеродных генов в клетках грамположительных бактерий налагает организация их белоксинтезирующего аппарата. Так, например, в рибосомах грамположительных бактерий отсутствует белок S1, который является наиболее крупным рибосомным белком грамотрицательных бактерий. Полагают, что белок S1 обусловливает связывание молекул РНК с рибосомой и перенос мРНК в сайт декодирования рибосомы. В отсутствие данного белка значительно

		TTGACA –35 ... TATAAT –10
а	**pBR325** ***tet***	CATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTTAATGCG
б	**pBR322** ***bla***	ATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAAC
в	**pACYC184** ***cat***	TCGGCACGTAAGAGGTTCCAACTTTCACCATAATGAA
г	**SPO1** ***26***	AGTTGTTGACTTTATCTACAAGGTGTGGCATAATAAT
д	**SPO1** ***15***	AGGTATTGACTTTCCCTACAGGGTGTGTAATAATTTA
е	**pE194** ***29K***	TCATGTTCATATTTATCAGAGCTCGTGCTATAATTAT
ж	**pC194** ***cat***	TAATATTGACTTTTAAAAAAGGATTGATTCTAATGAA

Рис. 10.19. Промоторные районы генов *E. coli* (*а–в*) и *B. subtilis* (*г–ж*).

Сверху приведены обобщенные последовательности областей –35 и –10 вегетативных промоторов *B. subtilis*. Соответствующие области в представленных промоторах подчеркнуты

а

		ΔG
pQS2	5' … AGGGGGGGGGGGGGAGCUGCCAUC[AUG]… 3'	–45,6 кДж/моль
pQS4	5' … UAUUGAAAGGGGGGAGCUGCCAUC[AUG]… 3'	–70,3 кДж/моль
16S рРНК	3' AUUCCUCCACUAGG … 5'	

б

		ΔG
pQS2	5' … AGGGGGGGGGGGGGAGCUGCCAUC[AUG]… 3'	–45,6 кДж/моль
pQS4	5' … UAUUGAAAGGGGGGAGCUGCCAUC[AUG]… 3'	–84,1 кДж/моль
16S рРНК	3' UCUUUCCUCCACUAG … 5'	

Рис. 10.20. Теоретически предсказанные участки связывания рибосом с молекулами мРНК, кодирующими DHFR, в *E. coli* (*а*) и в *B. subtilis* (*б*).

Приведены значения свободной энергии спаривания SD-участков (подчеркнуты) с 16S рРНК. Инициаторные кодоны обведены рамкой

возрастает роль другого механизма связывания рибосомой мРНК, а именно, комплементарного взаимодействия 5′-концевого района мРНК (SD-последовательности, см. 3.3) с 3′-концевой последовательностью 16S рРНК. Это подтверждается результатами расчетов свободной энергии спаривания (ΔG) рРНК с SD-участками большого числа разных бактериальных мРНК. Так, у *E. coli* ΔG варьирует от –17 до –92 кДж/моль со средним значением –48. У грамположительных бактерий ΔG изученных последовательностей находится в интервале от –50 до –88 кДж/моль со средним значением –70. Эти результаты однозначно доказывают, что для эффективной инициации трансляции в клетках бацилл и других грамположительных бактерий необходимым, хотя, по-видимому, не достаточным, условием является более строгая по сравнению с *E. coli* комплементарность SD-участка и 3′-конца 16S рРНК. Поэтому SD-последовательности у мРНК бацилл более протяженные, чем у *E. coli*.

Таким образом, для того, чтобы чужеродный ген мог правильно и эффективно экспрессироваться в клетках *B. subtilis*, он должен иметь бациллоподобную последовательность промотора, а на синтезируемой мРНК в участке связывания рибосом должна находиться достаточно протяженная последовательность, комплементарная 3′-концу 16S рибосомной РНК бацилл. Схожим образом организованы гены других грамположительных бактерий, что и обусловливает их экспрессию в клетках бацилл.

При клонировании в *B. subtilis* эукариотических генов вероятность их автономной экспрессии мала. Необходимость наличия в этих случаях строго определенных нуклеотидных последовательностей, определяющих инициацию транскрипции и трансляции генов в *B. subtilis*, элегантно продемонстрировали Т. Грэнг с соавторами в 1984 г. кДНК дигидрофолатредуктазы мыши встраивали по *Pst*I-участку в челночную векторную плазмиду pHV33, которая состоит из полных копий pC194 и pBR322, объединенных по *Hin*dIII-участку; в результате мутации в ней восстановлен маркер Tc^r. Полученная гибридная плазмида pQS1 детерминировала в клетках *E. coli* фенотип $Cm^r Tc^r Tp^r$, а в *B. subtilis* — только Cm^r. Синтез дигидрофолатредуктазы (DHFR), обусловливающей устойчивость клеток к триметоприму (Tp^r), выявляется в *E. coli* потому, что кДНК встроена в структурную часть гена β-лактамазы. В данном случае транскрипция химерного гена иницнируется с сигналов гена *bla*. Автономный синтез DHFR в *E. coli* может происходить за счет реинициации трансляции на AUG-кодоне кодирующей последовательности *dhfr*. В клетках же *B. subtilis* инициаторные сигналы гена *bla* не узнаются. Однако в результате селекции клеток *B. subtilis*[pQS1] на среде с триметопримом удалось отобрать вариант с фенотипом $Cm^r Tp^r$. Анализ показал, что в выделенном клоне клетки содержат измененную плазмиду pQS2, в которой произошла дупликация сегмента длиной 54 пн в районе промотора β-лактамазы. При этом спонтанно образовалась новая область –35, более специфичная для вегетативных промоторов *B. subtilis*, чем исходная в гене *bla*. Это, по-видимому, и привело к экспрессии гена *dhfr* мыши в составе pQS2 в клетках *B. subtilis*.

Дальнейший отбор клеток, содержащих pQS2, по признаку повышенного уровня активности DHFR (устойчивости к более высоким

Таблица 10.6. **Продукция дигидрофолатредуктазы мыши в клетках *E. coli* и *B. subtilis*, трансформированных гибридными плазмидами**

Плазмида	*E. coli*	*B. subtilis*
pQS1	1	$3 \cdot 10^{-8}$
pQS2	7	$4 \cdot 10^{-8}$
pQS4	570	$2 \cdot 10^{-4}$

Примечание. Уровень продукции в *E. coli* выражен в относительных единицах, в *B. subtilis* — концентрацией метотрексата (М), необходимой для ингибирования роста клеток на 50 %. Рост бесплазмидных клеток ингибировался на 50 % при концентрации метотрексата $3 \cdot 10^{-8}$ М.

концентрациям триметоприма) позволил выявить вариант данной плазмиды, в котором произошла спонтанная делеция сегмента длиной 564 пн, включающего 5′-конец кодирующей последовательности β-лактамазы. В выделенной плазмиде pQS4 сохранилась промоторная область pQS2 и сформировалась новая SD-последовательность, имеющая протяженный участок комплементарности с 16S рРНК *B. subtilis* (рис. 10.20). Таким образом, в результате двухступенчатой селекции удалось на основе гена *dhfr*, не экспрессируемого в *B. subtilis*, отобрать спонтанный вариант, обеспечивающий эффективный синтез эукариотического фермента как в грамположительной, так и в грамотрицательной бактерии (табл. 10.6).

К. Моранди с соавторами в 1983 г. после встройки кДНК дигидрофолатредуктазы человека по *Pst*I-участку плазмиды pHV14 также смогли селектировать делеционный вариант гибридной плазмиды, обеспечивающий трансформированным клеткам *B. subtilis* фенотип Tp^r. Рестрикционный анализ выделенной плазмиды pMP358 показал, что в исходной гибридной плазмиде произошла делеция сегмента ДНК размером 2072 пн, в результате чего кодирующая последовательность гена *dhfr* оказалась под контролем промотора гена хлорамфениколацетилтрансферазы pC194.

Рассмотренные примеры демонстрируют, что, если существует возможность селектировать клетки *B. subtilis* по продукции в них чужеродных белков, в системе *in vivo* удается формировать более продуктивные варианты. Такие варианты возникают случайно в результате спонтанных перестроек, происходящих в единичных плазмидных молекулах ДНК, и эффективно накапливаются при наличии строго селективного давления по искомому признаку. Однако для многих клонируемых чужеродных генов прямая селекция невозможна. Поэтому наиболее перспективным подходом к конструированию методами генетической инженерии штаммов *B. subtilis*, синтезирующих чужеродные полипептиды, является встройка изучаемых структурных генов под контроль регуляторных последовательностей известных генов, эффективно фуикционирующих в клетках бацилл.

10.3.2. Оптимизация экспрессии клонированных геное

Создание набора клонирующих молекулярных векторов и достигнутое понимание организации генов *Bacillus* дали толчок исследованиям по экспрессии чужеродных генов в *B. subtilis*. Особое значение для данной генно-инженерной системы имеет секреция целевых белков из клеток в окружающую среду, поэтому существенная часть этих экспериментов описана в разд. 10.2.4.

Представители рода *Bacillus* играют важную роль в биотехнологии как продуценты различных ферментов и метаболитов. Однако многие из этих полезных продуктов синтезируются в исходных бактериальных штаммах в небольших количествах. Для увеличения продуктивности выделённых штаммов используют методы статистического мутагенеза и отбора вариантов бактерий с улучшенными целевыми характеристиками. При таком подходе высокопродуктивные штаммы удается получить только после объемных и длительных экспериментов. Технология генетической инженерии позволяет достигнуть положительного эффекта в гораздо более короткие сроки.

Клонирование определенных генов бацилл в многокопийных векторных плазмидах приводит к значительному увеличению дозы гена и, как следствие, к повышению продуктивности бактериальных клеток по кодируемому этим геном белку. Так, например, в результате клонирования гена β-галактозидазы *B. stearothermophilus* в составе pUB110 продукция данного фермента в клетках *B. subtilis* оказалась в 50 раз выше, чем в штамме — доноре гена. Встройка в плазмиду pUB110 гена α-амилазы *Bacillus* sp., расщепляющей крахмал до мальтогексаозы, обусловила 70-кратное возрастание синтеза фермента.

Встройка кодирующих последовательностей генов в векторы экспрессии может обеспечивать еще более высокий уровень синтеза целевых белков. Например, М. Сибаков (1986 г.) поместил структурный ген термостабильной α-амилазы из *B. licheniformis* в вектор экспрес-

сии–секреции на основе элементов гена α-амилазы *B. amyloliquefaciens*. Это привело к тому, что плазмидосодержащие клетки *B. subtilis* стали производить термостабильную α-амилазу в количестве, превышающем уровень синтеза этого фермента в штамме-доноре в несколько сотен раз.

При клонировании целых оперонов в составе многокопийных векторных молекул можно добиться сверхсинтеза низкомолекулярных соединений, биосинтез которых контролируется генами этих оперонов. Так, сотрудники лаборатории А. И. Степанова (1982 г.) клонировали в составе бифункциональной векторной плазмиды фрагмент ДНК *B. subtilis* размером 9,5 тпн, содержащий целый рибофлавиновый оперон. Полученные гибридные плазмиды обеспечивали сверхсинтез рибофлавина в клетках *E. coli* и *B. subtilis*. Таким образом, методами генетической инженерии можно создавать технологически перспективные штаммы *B. subtilis*, продуцирующие в большом количестве не только белки, но и низкомолекулярные соединения типа аминокислот, витаминов и др.

Широкое применение в качестве экспрессирующего вектора нашла плазмида pPL608, полученная П. Ловеттом с сотрудниками в 1981 г. Она образована встройкой в pPL603 (см. рис. 10.7) промоторсодержащего фрагмента размером 278 пн, полученного из ДНК бацилльного фага SP02 гидролизом в условиях, изменяющих специфичность *Eco*RI на *Eco*RI*. Клонированный фрагмент имел такие концы, что мог выщепляться из гибридной pPL608 в обычных для *Eco*RI условиях гидролиза. После определения нуклеотидной последовательности этого фрагмента выяснилось, что наряду с сильным промотором в нем находится 5′-концевая кодирующая часть фагового гена. Таким образом, фрагмент ДНК фага SP02 в плазмиде pPL608 способен инициировать транскрипцию и трансляцию встроенных чужеродных последовательностей. Так, встройкой в pPL608 *Hin*dIII-фрагмента ДНК *E. coli*, несущего ген *trp*C, была получена плазмида pPL608-5, комплементирующая точковые мутации *B. subtilis* по генам *trp*D, C, F. Показано, что в трансформированных клетках *B. subtilis* гибридная плазмида направляет синтез индолглицерофосфатсинтетазы *E. coli*. А поскольку ген *E. coli* расположен внутри гена *cat* вектора, он может быть подвержен индукции хлорамфениколом (см. 10.2.1). После индукции субингибирующей концентрацией хлорамфеникола в *B. subtilis* уровень активности изучаемого фермента *E. coli* увеличивался в 7 раз. При этом транскрипция гибридного гена в pPL608-5 инициировалась с промотора вектора.

В. де Вос с соавторами (1983 г.) по *Pst*I-участку плазмиды pPL608 встроили ген *rec*A *E. coli*. В клетках *B. subtilis*, трансформированных гибридной плазмидой pPL608-A13, выявлялся синтез белка RecA *E. coli*. Транскрипция гена *rec*A инициировалась на промоторе фага SP02, а трансляция — на собственном участке связывания рибосом. Так как RBS гена *rec*A относительно слабо связывается с рибосомами *B. subtilis*, то уровень синтеза белка RecA в клетках бацилл был невысок. Чрезвычайно интересен тот факт, что белок RecA *E. coli* комплементировал *in vivo* функции белка RecE *B. subtilis*, хотя данные белки различаются по молекулярной массе (39 и 45 кДа соответственно). Клонированный в другой лаборатории в составе плазмиды pPL603 ген *rec*A *Proteus mirabilis* также комплементировал функции гена *rec*E *B. subtilis*. Как видим, ферментные системы общей рекомбинации таксономически различных бактерий имеют большое функциональное сходство, что, по-видимому, указывает на древнее происхождение этой системы.

Возможность не только эффективно синтезировать чужеродные белки, но и секретировать их из клеток в окружающую среду обеспечивает бациллам особое положение среди генно-инженерных систем. Например, в клетках *B. subtilis* можно синтезировать в секретируемой форме экзотоксины патогенных бактерий, протективные белки-антигены вирусов и бактерий. Наработка в биологически безопасной бактерии *B. subtilis* таких белков и выделение их в чистом виде позволяет более корректно изучать их свойства. Кроме того, такие препараты имеют и практическое значение, например, для ветеринарии или медицины.

Р. Новик с сотрудниками (1987 г.) клонировали в составе молекулярного вектора pBD64 ген *spe*A пирогенного экзотоксина типа А стрептококка (SPE A) или ген *tst*, кодирующий стафилококковый токсин-1 синдрома токсического шока (TSST-1). За счет повышенной дозы гена оба белка синтезировались в *B. subtilis* в значительно бóльших количествах, чем в природных бактериях, и, кроме того, эффективно секретировались из клеток. Все это позволило выделить исследуемые белки в индивидуальном виде и подробно изучить их свойства.

Использовав сигналы экспрессии и секреции гена *spe*A *Streptococcus pyogenes*, Ф. Лаплас с соавторами (1988 г.) создали новую векторную

систему челночного типа и продемонстрировали, что она способна направлять синтез интерферона α1 человека в клетках *E. coli*, *B. subtilis* и *Streptococcus sanguis*. П. Сэрис с соавторами (1990 г.) с помощью векторной системы экспрессии–секреции на основе гена α-амилазы *B. amyloliquefaciens* получили штаммы *B. subtilis*, раздельно синтезирующие и секретирующие в среду каждую из пяти субъединиц коклюшного токсина, который является важным компонентом современных противококлюшных вакцин.

Возможен и другой подход к оптимизации экспрессии чужеродных генов в клетках *B. subtilis*. Изучаемый структурный ген соединяют с синтетическим сегментом ДНК, кодирующим участок связывания рибосом, специфичный для бацилл. Такую конструкцию затем можно помещать под контроль разнообразных промоторов. В частности, используя различные синтетические сегменты ДНК, содержащие SD-последовательности, Дж. Флок с соавторами (1984 г.) получили гибридные плазмиды, которые в клетках *B. subtilis* направляли синтез полипептидного гормона человека урогастрона в свободном виде. Данный прием является достаточно общим и может быть использован при клонировании в клетках бацилл любых генов.

На основе вектора pPL603 в лаборатории С. Н. Щелкунова в 1988 г. сконструировали гибридную плазмиду pBMB105, содержащую химико-ферментативно синтезированный фрагмент, состоящий из промотора, участка связывания рибосом и ген-эквивалента сигнального пептида α-амилазы, состыкованного со структурным геном зрелой формы лейкоцитарного интерферона α2 человека. Данная плазмида направляла в клетках *B. subtilis* синтез и секрецию в окружающую среду биологически активного интерферона. Плазмида pBMB105 затем была введена в штаммы бацилл, используемые в ветеринарии и медицине в качестве лечебных препаратов для перорального (через рот) применения. Созданные штаммы и производимые на их основе препараты показали высокую эффективность в защите сельскохозяйственных животных от различных заболеваний. Более того, один из полученных вариантов *B. subtilis* в клинических испытаниях показал высокий терапевтический эффект при лечении вирусных гепатитов человека. Несомненно, разработка штаммов бацилл, продуцирующих и секретирующих различные цитокины человека и животных, не только представляет научный интерес, но и имеет большое практическое значение для ветеринарии и здравоохранения как направление по созданию нового типа лечебных форм для перорального применения.

Бациллы имеют сложный цикл дифференцировки, и у них существуют гены, функционирующие на определенных стадиях клеточного развития. Поэтому можно применять промоторы, которые будут включать экспрессию чужеродного гена в желаемой экспериментатору фазе клеточного цикла.

При конструировании гибридных генов кодирующую последовательность можно помещать под контроль тандемно повторенных промоторов. Это, как правило, приводит к увеличению эффективности транскрипции изучаемого гена. Собирая блоки из двух-трех различных промоторов с разной системой репрессии–индукции, можно гибко регулировать экспрессию целевого гена и обеспечивать сверхсинтез кодируемого им белка.

Особое значение для генно-инженерной системы бацилл имеет получение мутантов бактерий со сниженной активностью протеаз, и прежде всего экзопротеаз. Для многих чужеродных белков только использование мутантов *B. subtilis*, дефектных по протеазам, позволяет обеспечить высокий уровень их внеклеточной продукции.

Разработка методологии клонирования генов в клетках *B. subtilis* вывела на качественно новый уровень молекулярно-генетические исследования данной грамположительной бактерии. В клетках *B. subtilis* в составе фаговых или плазмидных ДНК клонирован широкий спектр хромосомных генов бацилл, в том числе *spo*-гены, участвующие в регуляции спорообразования, гены α-амилаз, пенициллиназ, протеаз. При этом, как уже отмечалось, за счет повышенной дозы гена в клетках, содержащих гибридные плазмиды, обычно наблюдается сверхсинтез соответствующих продуктов.

10.4. СТАБИЛЬНОСТЬ ПЛАЗМИД В КЛЕТКАХ *B. SUBTILIS*

При разработке любой векторной системы необходимо подобрать условия, в которых гибридные молекулы ДНК эффективно реплицируются, правильно распределяются между дочерними клетками и не подвергаются структурным перестройкам при многократных пересевах культур бактерий. Особенно это важно при создании штаммов-продуцентов, предназначенных для крупномасштабного культивирования.

Хотя система клонирования генов в клетках *B. subtilis* изучена в меньшей степени, чем генно-инженерная система *E. coli*, накопленные данные позволяют сделать некоторые выводы о стабильности гибридных плазмид в клетках бацилл.

Как уже отмечалось (см. 10.2.1), большинство плазмид *Staphylococcus aureus* относительно нестабильны в клетках *B. subtilis*. Это обусловлено тем, что в гетерологичном окружении происходит разбалансировка процесса репликации плазмид этого класса. Плазмида *S. aureus* pC194 и ее производные в клетках *B. subtilis* часто подвергаются делециям. Причем этот процесс является *rec*E-независимым, а образовавшиеся *in vivo* делеционные варианты затем обычно стабильно сохраняют свою структуру.

Из изученных плазмид лишь pUB110 и ее гибридные производные характеризуются достаточно высокой стабильностью в клетках бацилл. При культивировании плазмидосодержащих штаммов на питательных средах без антибиотиков заметная потеря клетками плазмид наблюдается только в постэкспоненциальной и стационарной фазах роста культуры, что обычно мало сказывается на продуктивности штаммов по целевому белку. Большое значение для стабильного поддержания гибридных плазмид в клетках бацилл имеет состав питательной среды и условия культивирования. Поэтому при создании технологических процессов на основе штаммов-продуцентов, конструируемых методами генетической инженерии, необходимо уделять пристальное внимание выбору оптимальных условий культивирования.

Нестабильность структуры гибридных плазмид иногда может быть обусловлена влиянием на них клонированного репликатора или сильного промотора. В результате рекомбинационных событий *in vivo* спонтанно образуются стабильные варианты плазмид, у которых интерференция чужеродной ДНК преодолевается. Такие плазмиды чаще всего являются делеционными производными исходных гибридных молекул ДНК. Повторяющиеся последовательности, которые могут возникать в гибридных плазмидах, также обусловливают нестабильность их структуры.

Особую проблему при работе с *B. subtilis* представляет нестабильность гибридов на основе двурепликонных плазмид. Большинство из этих плазмид стабильно поддерживаются в клетках *E. coli* даже при отсутствии селективного давления, а в *B. subtilis* в тех же условиях они могут теряться с высокой частотой. Так, после 10 делений клеток *B. subtilis* в неселективных условиях частота утраты плазмид (%) составляет:

pBC16-1	< 0,1	pJK3-1	65
pBS161-1	23	pJK 201	65
pJK302	4	pJK 310	98,5
pJK502	35	pJK 523	98

Более того, в процессе трансформации компетентных клеток *B. subtilis* некоторые гибридные бифункциональные плазмиды с высокой частотой подвергаются делециям, чего не происходит при введении этих же плазмид в компетентные клетки *E. coli*. Данный факт может объясняться тем, что механизм проникновения экзогенных молекул ДНК в клетки *E. coli* и *B. subtilis* различается (см. 2.1.2, 10.1.2). Максимальный размер молекул ДНК, которые могут входить в компетентные клетки *B. subtilis*, составляет примерно 30 тпн. В то же время известно, что трансформация клеток *B. subtilis* осуществляется в основном тримерами плазмид. А поскольку челночные плазмиды обычно бывают крупными, то тримерная форма гибридов на их основе по размеру может превысить 30 тпн. Это, по-видимому, резко снижает эффективность трансформации клеток *B. subtilis* и способствует отбору различных делеционных производных исходной гибридной плазмиды. Преодолеть данное затруднение можно достаточно просто, если вводить плазмидную ДНК в клетки бацилл электропорацией или осуществлять плазмидную трансформацию протопластов клеток.

При работе с бифункциональными векторами может возникать ситуация, когда размноженные в *E. coli* гибридные молекулы ДНК будут подвергаться атаке системой рестрикции *B. subtilis*, что приведет к снижению уровня плазмидной трансформации бацилл и появлению делеционных вариантов плазмид. В таких случаях необходимо использовать штаммы *Bacillus*, мутантные по системе рестрикции.

Образование делеционных вариантов гибридных плазмид может происходить не только в процессе трансформации компетентных клеток *B. subtilis*, но и при пассировании плазмидосодержащих культур бактерий. Возникшие *in vivo* делеционные производные плазмид, как правило, при дальнейших пассажах культуры стабильно сохраняют свою структуру.

При определенных условиях культивирования клетки, не несущие плазмид, могут иметь преимущество в размножении перед плазмидосодержащими бактериями. В таких случаях про-

исходит обогащение популяции бесплазмидными клетками и постепенная, иногда очень быстрая, утрата плазмиды бактериальной культурой.

Как видим, поведение гибридных плазмид в клетках *B. subtilis* во многом подчиняется тем же законам, что и в *E. coli*.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Биотехнология: Учеб. пособие для вузов. В 8 кн. / Под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. Кн. 2. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов / В. Г. Дебабов, В. А. Лившиц. М.: Высш. шк., 1988. 208 с.

Щелкунов С. Н. Клонирование генов. Новосибирск: Наука, 1986. 228 с.

Albano M., Hahn J., Dubnau D. Expression of competence genes in *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. 1987. Vol. 169. P. 3110–3117.

Beal B., Moran C. P. Cloning and characterization of *spo*VR, a gene from *Bacillus subtilis* involved in spore cortex formation // J. Bacteriol. 1994. Vol. 176. P. 2003–2012.

Carmi O. A., Stewart G. S. A. B., Ulitzur S., Kuhn J. Use of bacterial luciferase to establish a promoter probe vehicle capable of nondestructive real-time analysis of gene expression in *Bacillus* spp. // J. Bacteriol. 1987. Vol. 169. P. 2165–2170.

Chak K.-F., Tseng M.-Y., Yamamoto T. Expression of the crystal protein gene under the control of the α-amylase promoter in *Bacillus thuringiensis* strains // Appl. Envir. Microbiol. 1994. Vol. 60. P. 2304–2310.

Edelman A., Joliff G., Klier A., Rapport G. A system for the inducible secretion of proteins from *Bacillus subtilis* during logarithmic growth // FEMS Microbiol. Lett. 1988. Vol. 52. P. 117–120.

Errington J. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis // Microbiol. Rev. 1993. Vol. 57. P. 1–33.

Errington J., Jones D. Cloning in *Bacillus subtilis* by transfection with bacteriophage vector ϕ105J27: Isolation and preliminary characterization of transducing phages for 23 sporulation loci // J. Gen. Microbiol. 1987. Vol. 133. P. 493–502.

Flock J., Fotherringham I., Light J. et al. Expression in *Bacillus subtilis* of the gene for human urogastrone using synthetic ribosome binding sites // Mol. Gen. Genet. 1984. Vol. 195. P. 246–251.

Gahnestock S. R., Fisher K. E. Expression of the staphylococcal protein A gene in *Bacillus subtilis* by gene fusions utilizing the promoter from a *Bacillus amyloliquefaciens* α-amylase gene // J. Bacteriol. 1986. Vol. 165. P. 796–804.

Gruss A. D., Ross H. F., Novick R. P. Functional analysis of a palindromic sequence required for normal replication of several staphylococcal plasmids // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. Vol. 84. P. 2165–2169.

Harington A., Watson T. G., Louw M. E. et al. Stability during fermentation of a recombinant α-amylase plasmid in *Bacillus subtilis* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1988. Vol. 27. P. 521–527.

Hashiguchi K., Tanimoto A., Namura S. et al. Amplification of the *amy*E–*tmr*B region on the chromosome in tunicamycin-resistant cells of *Bacillus subtilis* // Mol. Gen. Genet. 1986. Vol. 204. P. 36–43.

Hirata H., Negoro S., Okada H. High production of thermostable β-galactosidase of *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus subtilis* // Appl. Envir. Microbiol. 1985. Vol. 49. P. 1547–1549.

Honjo M., Akaoka A., Nakayama A., Furutani Y. Secretion of human growth hormone in *Bacillus subtilis* using prepropeptide coding region of *Bacillus amyloliquefaciens* neutral protease gene // J. Biotechnol. 1986. Vol. 4. P. 63–71.

Honjo M., Nakayama A., Lio A. et al. Construction of a highly efficient host-vector system for secretion of heterologous protein in *Bacillus subtilis* // J. Biotechnol. 1987. Vol. 6. P. 191–204.

Kallio P., Palva A., Palva I. Enhancement of α-amylase production by integrating and amplifying the α-amylase gene of *Bacillus amyloliquefaciens* in the genome of *Bacillus subtilis* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1987. Vol. 27. P. 64–71.

Kimura K., Tsukamoto A., Ishii Y. et al. Cloning of a gene for maltohexaose producing amylase of an alkalophilic *Bacillus* and hyperproduction of the enzyme in *Bacillus subtilis* cells // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1988. Vol. 27. P. 372–377.

Kreiswirth B. N., Handley J. P., Schirvert P. M., Novick R. P. Cloning and expression of streptococcal pyrogenic exotoxin A and staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1 in *Bacillus subtilis* // Mol. Gen. Genet. 1987. Vol. 208. P. 84–87.

Kusaoke H., Hayashi Y., Kadowaki Y., Kimoto H. Optimum conditions for electric pulse-mediated gene transfer to *Bacillus subtilis* cells // Agric. Biol. Chem. 1989. Vol. 53. P. 2441–2446.

Laplace F., Hatrmann M., Klessen C. et al. Expression of the human interferon-α1 gene under transcriptional and translational control of the *spe*A gene // J. Basic Microbiol. 1988. Vol. 28. P. 55–61.

Leonhardt H., Alonso J. C. Construction of a shuttle vector for inducible gene expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* // J. Gen. Microbiol. 1988. Vol. 134. P. 605–609.

Lundsrom K. Expression of the vesicular stomatitis virus membrane glycoprotein gene in *Bacillus subtilis* // FEMS Microbiol. Lett. 1984. Vol. 23. P. 65–70.

Mori M., Hashiguchi K. I., Yoda K., Yamasaki M. Designed gene amplification on the *Bacillus subtilis* chromosome // J. Gen. Microbiol. 1988. Vol. 134. P. 85–95.

Mosbach K., Birnbaum S., Hardy K. et al. Formation of proinsulin by immobilized *Bacillus subtilis* // Nature. 1983. Vol. 302. P. 543–545.

Nakamura K., Fujita Y., Itoh Y., Yamane K. Modification of length, hydrophobic properties and electric charge of *Bacillus subtilis* α-amylase signal peptide and their different effects on the production of secretory proteins in *B. subtilis* and *Escherichia coli* cells // Mol. Gen. Genet. 1989. Vol. 216. P. 1–9.

Palva I., Lehtovaara P., Kaariainen L. et al. Secretion of interferon by *Bacillus subtilis* // Gene. 1983. Vol. 22. P. 229–235.

Reid S. J., Sugrue J. A., Thomson J. A. Industrial applications of a cloned neutral protease gene in *Bacillus subtilis* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1986. Vol. 24. P. 311–318.

Saris P., Taira S., Airaksien U. et al. Production and secretion of pertussis toxin subunits in *Bacillus subtilis* // FEMS Microbiol. Lett. 1990. Vol. 68. P. 143–148.

Saunders C. W., Schmidt B. J., Mallonee R. L., Guyer M. S. Secretion of human serum albumin from *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. 1987. Vol. 169. P. 2917–2925.

Smith H., Bron S., Van Ee J., Venema G. Construction and use of signal sequence selection vectors in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* // J. Bateriol. 1987. Vol. 169. P. 3321–3328.

Trieu-Cuot P., Carlier C., Martin P., Courvalin P. Plasmid transfer by conjugation from *Escherichia coli* to gram-positive bacteria // FEMS Microbiol. Lett. 1987. Vol. 48. P. 289–294.

Vasantha N., Thompson L. D. Secretion of a heterologous protein from *Bacillus subtilis* with the aid of protease signal sequences // J. Bacteriol. 1986. Vol. 165. P. 837–842.

de Vos W., de Vries S., Venema G. Cloning and expression of the *Escherichia coli recA* gene in *Bacillus subtilis* // Gene. 1983. Vol. 25. P. 301–308.

Young M. Gene amplification in *Bacillus subtilis* // J. Gen. Microbiol. 1984. Vol. 130. P. 1613–1621.

Глава 11
ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫЕ СИСТЕМЫ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ, НЕ ОТНОСЯЩИХСЯ К РОДУ *BACILLUS*

В последние годы внимание исследователей привлекает разработка векторных систем бактерий, имеющих большое практическое значение в пищевой, медицинской промышленности, являющихся возбудителями различных заболеваний человека и животных.

Необходимо отметить, что используемые подходы базируются прежде всего на том большом опыте, который был накоплен в ходе генно-инженерных исследований на *E. coli* и *B. subtilis*.

11.1. БАКТЕРИИ РОДА *STREPTOCOCCUS*

Методология рекомбинации молекул ДНК *in vitro* универсальна. Поэтому возможность проведения генно-инженерных экспериментов на выбранном виде бактерий определяется способностью клеток к генетической трансформации и наличием векторных молекул.

Лишь у немногих из изученных видов грамположительных бактерий выявлена физиологическая компетентность для генетической трансформации. Лидирующее положение здесь занимает род *Streptococcus*: по крайней мере для трех видов этих бактерий (*S. mutans*, *S. sanguis*, *S. pneumoniae*) доказана возможность генетической трансформации компетентных клеток. Кроме того, начиная с 1972 г. в бактериях этого рода обнаружено и изучено несколько десятков различных плазмид, которые дают богатый материал для создания эффективных клонирующих векторов.

Стрептококки представляют собой большую гетерогенную группу. Большинство видов являются факультативными анаэробами и неподвижны. Они имеют тенденцию формировать цепочки из клеток, особенно при культивировании *in vitro*. Большое значение для пищевой промышленности имеют *S. lactis*, *S. cremoris* и некоторые другие виды, объединяемые в группу молочнокислых стрептококков. Способность этих бактерий коагулировать молоко в значительной степени определяется тем, могут ли они метаболизировать лактозу и расщеплять казеин. Доказано, что проявление этих свойств связано с наличием в клетках плазмид размером от 45 до 70 тпн. *S. faecalis* является представителем нормальной микрофлоры кишечника человека и животных. Некоторые штаммы этой группы стрептококков могут быть патогенными. *S. pyogenes* — один из основных возбудителей различных гнойных заболеваний. Большая группа стрептококков (*S. sanguis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. mitior*) населяет ротовую полость, при этом главным «виновником» кариеса зубов является *S. mutans*. В разных регионах от 40 до 70 % взрослого населения принадлежит к числу носителей *S. pneumoniae*, чаще известного как пневмококк. При нарушении нормальных защитных механизмов (например, при вирусной инфекции дыхательных путей) бактерии из зева проникают в легкие и вызывают развитие пневмококковой пневмонии, которая может иметь летальный исход.

Как видим, стрептококки представляют большой интерес для исследователей, и поэтому они интенсивно изучаются. Показано, что у *S. faecalis* и *S. lactis* довольно часто встречаются штаммы, несущие пять или более разных плазмид, а бесплазмидные изоляты очень редки. Напротив, в штаммах *S. mutans* и *S. pneumoniae* плазмиды выявляются относительно редко. Размеры плазмид варьируют от нескольких тысяч пар нуклеотидов до 115 тпн, однако более 85 % описанных плазмид имеют размер меньше 60 тпн. Плазмиды размером не более 10 тпн обычно являются многокопийными (от 10 до 30 копий на хромосому), более крупные плазмиды, как правило, низкокопийны (1–2 молекулы

Таблица 11.1. **Клонирующие векторы бактерий рода *Streptococcus***

Плазмида	Размер, тпн	Маркеры	Родительские плазмиды	Исходная бактерия-хозяин
pVA1	11,0	Em^r	pAMβ1	*S. faecalis*
pVA677	7,5	Em^r	pVA1	
pVA380-1	4,4	Криптическая	—*	*S. ferus*
pVA680	8,3	Em^r	pVA380-1 pVA1	
pVA736	7,6	Em^r	То же	
pVA743	13,9	Em^rCm^r	pVA736 pIP501	 *S. agalactiae*
pVA749	5,0	Em^r	pVA380-1 pVA1	
pVA856	9,2	Em^r Cm^r Tc^r	pVA749 pACYC184	 *E. coli*
pDB101	18,0	Em^r	pSM19035	*S. pyogenes*
pDB201	7,4	Em^r	pVA318 pSM19035	*S. faecalis*
pGB301	9,3	Em^rCm^r	pIP501	
pGB307	4,9	Em^r	pGB301	
pSM10	8,1	То же	pSM10419	*S. pyogenes*
ΔpSM19035	18,0	— « —	pSM19035	
pSM10221	12,4	Em^rCm^r	pSM10 pC221	 *Staph. aureus*
pMV158	5,2	Tc^r	—*	*S. agalactiae*
pAM77	6,8	Em^r	—*	*S. sanguis*
pAM401	10,4	Cm^r Tc^rCm^r	pGB354 pACYC184	*S. agalactiae* *E. coli*
pAM510	10,2	Em^rSm^r	pAD2 pVA736	*S. faecalis*
pAM511	11,3	Em^r Km^r	То же	
pLS1	4,3	Tc^r	pMV158	*S. pneumoniae*
pIL252	4,6	Em^r	pHV1301	*S. faecalis*
pIL277	4,3	Em^r	pIL252	
pAT127	10,5	Nm^r	pAMβ1 pBR322 RK2	*S. faecalis* *E. coli* *E. coli*
pCK1	5,5	Cm^r Nm^r	pSH71 pBD64	*S. lactis* *B. subtilis* (*Staph. aureus*)

* Природная плазмида.

на хромосому). Плазмиды стрептококков могут детерминировать различные функции, включая конъюгативный перенос, устойчивость к антибиотикам, утилизацию лактозы, сахарозы, цитрата, синтез гемолизинов, протеаз, бактериоцинов и др.

В плане генетической трансформации компетентных клеток наиболее хорошо изучен *S. sanguis*, и поэтому усилия по созданию векторной системы стрептококков прежде всего были сконцентрированы на бактериях этого вида. Оказалось, что репликоны стафилококковых плазмид pE194, pC194 и pUB110, работающие в клетках бацилл, не функционируют в клетках стрептококков (хотя гены устойчивости к антибиотикам этих плазмид способны экспрессироваться в стрептококках). Поэтому возникла необходимость создания новых удобных клонирующих векторов, пригодных для проведения генно-инженерных экспериментов на бактериях рода *Streptococcus*.

В одной из первых работ Ф. Марцина с соавторами (1980 г.), используя детерминанту устойчивости к эритромицину плазмиды pVA1 и репликон криптической плазмиды pVA380-1, сконструировали химерные плазмиды pVA680,

pVA736, pVA749 и некоторые другие, эффективно выполняющие функции молекулярных векторов в клетках *S. sanguis* (табл. 11.1). В дальнейшем выяснилось, что векторы данного типа могут с успехом использоваться в бактериях других видов рода *Streptococcus*. При этом необходимо было для каждого вида, не обладающего компетентностью, провести кропотливую работу по оптимизации процедуры получения протопластов, их плазмидной трансформации и условий регенерации клеточной стенки.

Для расширения возможностей проведения экспериментов с изолированными генами получены также челночные плазмиды *E. coli* – *Streptococcus*, *Staphylococcus* – *Streptococcus*, *Bacillus* – *Streptococcus*. Один из векторов такого типа — pAM401 — создали Р. Вирт с соавторами (1986 г.), объединив плазмиду *E. coli* pACYC184 (Tc^rCm^r), расщепленную по уникальному участку узнавания рестриктазы *Ava*I, со стрептококковой плазмидой pGB354 (Cm^r), гидролизованной по единственному *Sph*I-сайту (рис. 11.1). Поскольку гены *E. coli* в грамположительных клетках практически не экспрессируются, авторы проявили изобретательность и осуществили ступенчатую селекцию. Смесь линеаризованных плазмид обрабатывали ДНК-полимеразой («затупление» выступающих одноцепочечных концов), ДНК-лигазой фага Т4 и трансформировали протопласты *S. faecalis*, отбирая плазмидосодержащие трансформанты на среде с хлорамфениколом. Из выросшей после этого популяции клеток выделяли плазмидную ДНК и трансформировали ею компетентные клетки *E. coli* с последующей селекцией на среде с хлорамфениколом и тетрациклином. Из отобранных клонов бактерий снова выделяли плазмидную ДНК и трансформировали ею протопласты *S. faecalis*. Проведя три цикла таких переносов плазмид из одного хозяина в другого, отобрали трансформант, содержащий плазмиду pAM401. Полученный челночный вектор может применяться в широком круге хозяев, так как использованный репликон стрептококковой плазмиды эффективно функционирует в клетках по крайней мере 9 видов стрептококков, в *Lactobacillus casei*, *Staphylococcus aureus* и *Pediococcus* spp.

Интересен пример создания плазмиды pCK1 (см. табл. 11.1). М. Гэссон и П. Андерсон (1985 г.) выделили *Taq*I-фрагмент плазмиды pBD64 (см. табл. 10.3) размером 3,8 тпн, не содержащий плазмидного репликона, но несущий гены устойчивости к хлорамфениколу и неомицину (экспрессируются в грамположительных

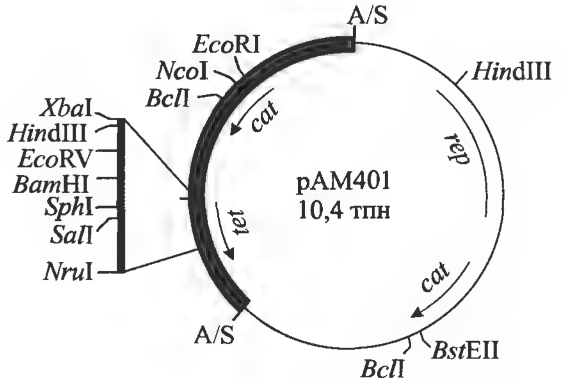


Рис. 11.1. Карта челночной плазмиды pAM401.

Толстой линией обозначена последовательность pACYC184, тонкой — pGB354; A/S — участок лигирования плазмид по сайтам *Ava*I и *Sph*I

бактериях). В качестве донора репликона использовали криптическую плазмиду pSH71 *S. lactis*, которую гидролизовали рестриктазой *Cla*I, а полученные фрагменты лигировали с изолированным фрагментом pBD64. Данным препаратом ДНК трансформировали протопласты *B. subtilis* и на среде с хлорамфениколом отбирали клоны трансформантов (клетки, содержащие фрагмент pBD64, объединенный с репликатором pSH71), которые затем проверяли на наличие неселектируемого признака Nm^r. Созданная плазмида pCK1, выделенная из *B. subtilis*, эффективно трансформировала протопласты *S. lactis*, и ее копийность составляла около 60 молекул на хромосому.

Д. Симон и А. Чопин (1988 г.) сконструировали серию pIL-плазмид из родительской плазмиды pHV1301, которая является делеционным вариантом pAMβ1, спонтанно полученным при трансформации компетентных клеток *B. subtilis*. В основе использованного подхода — введение полилинкера в состав плазмиды и уменьшение ее размера (рис. 11.2).

Формирование обширного набора клонирующих векторов позволяет рассчитывать на успешное изучение генетической организации стрептококков. Так, Дж. Кондо и Л. Мак-Кэй в составе pGB301 клонировали протяженный фрагмент плазмиды pLM2001 *S. lactis*, содержащий весь набор *lac*-генов. Комплементацией мутанта *S. sanguis* по гену фосфо-β-*D*-галактозидазы был выделен индивидуальный ген данного фермента. Дальнейшие эксперименты позволят подробно исследовать генетическую систему метаболизма лактозы, а значит, найти путь оптимизации ее функционирования применительно к технологии пищевой промышленности.

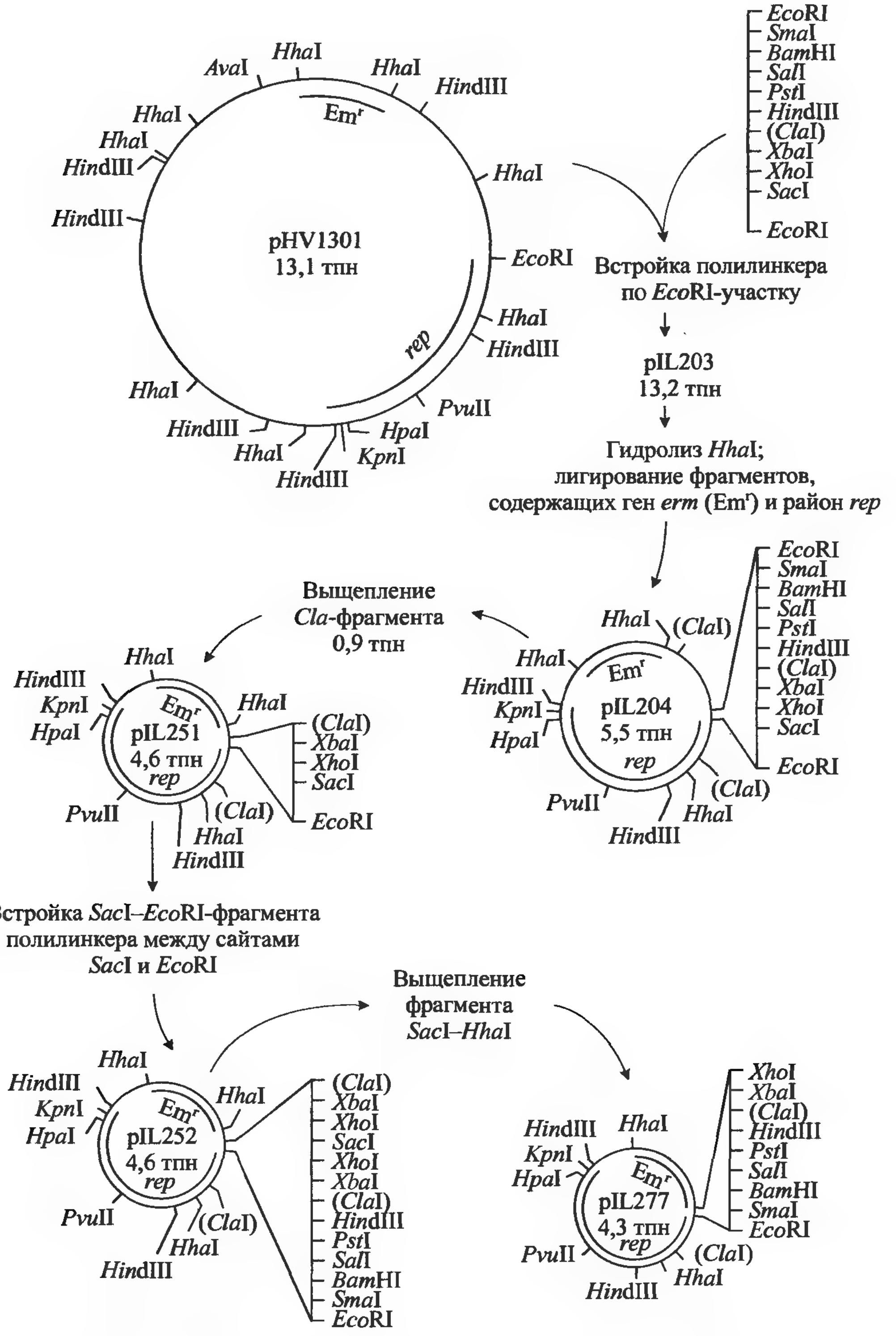


Рис. 11.2. Создание набора плазмид для молекулярного клонирования в *Streptococcus lactis*

В качестве другого примера можно привести работу К. Ронда с соавторами (1987 г.). Используя вектор pLS1, им удалось клонировать ген N-ацетилмурамоил-*L*-аланинамидазы *S. pneumoniae* и в прямом эксперименте доказать, что данный фермент катализирует процесс расхождения дочерних клеток на конечной стадии клеточного деления. Более того, этот аутолизин играет важную роль в действии β-лактамных антибиотиков, так как в том случае, когда соответствующий ген в бактерии нарушен, их бактерицидный эффект предотвращается.

Активно изучается *S. mutans*, как один из основных этиологических агентов кариеса зубов. Разработаны системы модельных животных, на которых определяется вирулентность разных штаммов, устанавливаются факторы

патогенности этих бактерий. В частности, считается, что патогенность *S. mutans* прежде всего связана со способностью синтезировать водонерастворимые гликаны из сахарозы. Генетическая инженерия дает возможность более подробно изучить этот процесс и предложить способы преодоления патогенного эффекта.

Клонирование отдельных генов или наборов генов стрептококков и изучение их экспрессии в гомологичном внутриклеточном окружении позволит глубже понять регуляцию функционирования этих генов, выявить индивидуальные особенности различных видов бактерий рода *Streptococcus*.

11.2. БАКТЕРИИ РОДА *STREPTOMYCES*

Актиномицеты рода *Streptomyces* являются почвенными грамположительными бактериями, которые в отличие от большинства прокариотических микроорганизмов в своем жизненном цикле проходят несколько стадий дифференцировки. Типичный жизненный цикл стрептомицета на твердом субстрате начинается с прорастания споры, дающей начало полигеномному субстратному мицелию, на котором затем формируется воздушный мицелий, преобразующийся в конце цикла развития в цепочки спор. В глубинных культурах споруляция обычно не происходит. В этом случае по завершении вегетативного роста культура сохраняет биосинтетическую активность и способна продуцировать большие количества вторичных метаболитов или осуществлять биоконверсию специфичных соединений.

Наиболее важными с практической точки зрения продуктами вторичного метаболизма стрептомицетов являются антибиотики. Так, до 70 % всех производимых промышленностью антибиотиков синтезируются именно бактериями этого рода. Стрептомицеты синтезируют антибиотики различной химической природы: аминогликозиды, макролиды, тетрациклины, β-лактамы, олигопептиды и др. Индивидуальный штамм обычно продуцирует несколько антибиотиков, относящихся к разным классам. Кроме того, часто схожие или идентичные антибиотики синтезируются разными видами стрептомицетов.

Процессы вторичного метаболизма тесно связаны с дифференцировкой стрептомицетов и регулируются большим числом генов. Познание тонких механизмов этой регуляции имеет важное значение как для фундаментальной науки, так и для практических целей. Большую помощь здесь должна оказать генетическая инженерия. Именно стремление создать новые типы штаммов-продуцентов на основе бактерий рода *Streptomyces* стимулировало разработку для них генно-инженерной системы. Следует подчеркнуть, что стрептомицеты синтезируют широкий спектр внеклеточных ферментов. Поэтому по аналогии с бациллами могут быть созданы штаммы стрептомицетов, секретирующих из клеток целевые белки. Важной особенностью стрептомицетов является также то, что они не патогенны ни для человека, ни для животных. Известен лишь единственный вид (*S. scabies*), патогенный для растений.

Геном бактерий рода *Streptomyces* представлен одной молекулой кольцевой двухцепочечной ДНК размером около 10^4 тпн (в 2,5 раза протяженней, чем у *E. coli*). Для стрептомицетов характерно очень высокое (70–73 %) содержание в ДНК GC-пар. (У бактерий рода *Escherichia* этот показатель составляет около 50 %, а у *Bacillus* — 32–62 %.) Многие штаммы стрептомицетов имеют естественную систему генетического обмена через конъюгацию, направляемую половыми факторами. Хотя механизм этого процесса пока полностью не ясен, проведенные исследования позволяют сделать заключение, что конъюгационная система *Streptomyces* генетически устроена намного проще, чем F-фактор *E. coli*. К наиболее изученным в генетическом плане относятся штаммы *S. coelicolor* A3(2) и *S. lividans* 66. Для них получено и охарактеризовано большое число различных мутантов.

Стрептомицеты не обладают физиологической компетентностью для генетической трансформации, но данное затруднение легко преодолевается при использовании протопластов клеток. Необходимо учитывать, что многие штаммы стрептомицетов несут гены системы рестрикции–модификации. Особенно это характерно для промышленных штаммов, отбираемых с учетом их приспособленности к культивированию в больших ферментерах. Одним из параметров такой приспособленности является устойчивость клеток к фаголизису, которая часто может обеспечиваться высоким уровнем рестриктазной активности.

Для стрептомицетов характерно явление, позволяющее методически просто обнаружи-

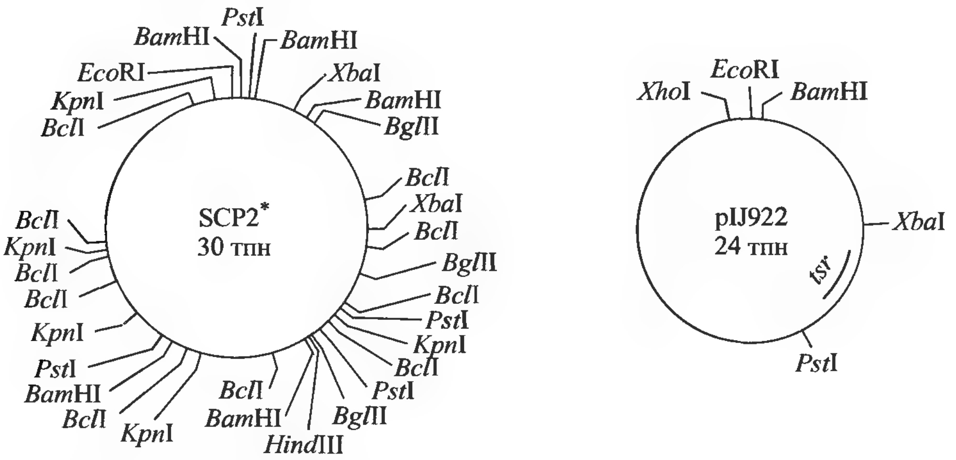


Рис. 11.3. Рестрикционные карты плазмид SCP2* и pIJ922.

Для pIJ922 приведены сайты рестриктаз, пригодные для клонирования фрагментов ДНК

вать штаммы, несущие конъюгативные плазмиды. Оказалось, что при попадании спор или регенерирующих протопластов плазмидосодержащего штамма на свежезасеянный газон бесплазмидных клеток формируются фенотипически выявляемые микроколонии — ***оспины***. Оспины образуются в результате того, что в клетках реципиентного штамма (клетках газона), получивших в результате конъюгации плазмиду, замедляется процесс споруляции и микроколония плазмидосодержащего клона на газоне сплошного роста бесплазмидных клеток оказывается окруженной прозрачной кольцевой зоной. Данную реакцию ингибирования роста называют ***летальным зигозисом***, и ее фенотипическое проявление обозначают Ltz^+. Наличие признака Ltz^+ позволило идентифицировать плазмиды у большого числа штаммов *Streptomyces*. Именно трансмиссивные плазмиды явились основой для создания многочисленных клонирующих молекулярных векторов стрептомицетов.

Первой изученной плазмидой стрептомицетов стала плазмида SCP2 штамма *S. coelicolor* A3(2), которую Д. Хопвуд с сотрудниками описали в 1975 г. Это половая низкокопийная плазмида размером 30 тпн. Спонтанно был выделен вариант данной плазмиды SCP2*, обеспечивающий значительно бóльшую эффективность хромосомной рекомбинации и более интенсивное проявление клетками фенотипа Ltz^+. С помощью рестрикционного анализа не удалось обнаружить различий в структуре ДНК SCP2 и SCP2*, кроме того, эти плазмиды имеют одинаковую копийность в клетках (1–5 копий на бактериальную хромосому). Физическое (рис. 11.3) и генетическое картирование SCP2* позволило сделать вывод о том, что гены, контролирующие репликацию плазмиды, перенос, хромосомную рекомбинацию и летальный зигозис, локализованы в левой половине карты, так как производные SCP2*, содержащие только наибольший *Pst*I- или *Bam*HI-фрагмент, проявляют все эти свойства. Однако такие варианты плазмиды с высокой частотой утрачиваются клетками, в то время как плазмида, состоящая из наибольшего *Pst*-фрагмента и прилегающего к нему по часовой стрелке другого *Pst*-фрагмента, стабильно поддерживается в культуре стрептомицетов.

Первый генно-инженерный эксперимент на бактериях рода *Streptomyces* выполнили в 1980 г. М. Биб с соавторами, встроив ген устойчивости к метиленомицину плазмиды SCP1 в состав плазмиды SCP2.

Низкокопийные векторы важны для клонирования генов, которые детерминируют синтез продуктов, токсичных в высоких концентрациях для клеток-хозяев. К таким продуктам относятся, в частности, антибиотики. На основе SCP2* получен ряд векторных плазмид, содержащих разные гены устойчивости к антибиотикам, в том числе к тиострептону — *tsr* (см. рис. 11.3), неомицину — *aph*, а также ген *mel*, направляющий синтез тирозиназы — фермента, превращающего тирозин в меланиновый пигмент. Последняя детерминанта обусловливает черную окраску колоний *Streptomyces* на среде, содержащей триптон и ионы меди. При инактивации гена *mel* за счет встройки чужеродных последовательностей колонии трансформантов оказываются бесцветными, что обеспечивает возможность прямого фенотипического отбора клонов, несущих гибридные плазмиды. Экспериментально показано, что векторные производные SCP2* способны трансформиро-

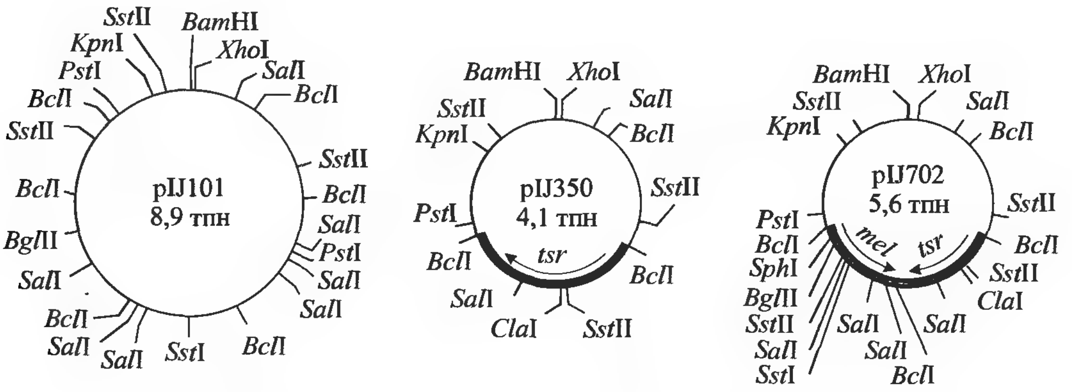


Рис. 11.4. Рестрикционные карты плазмиды pIJ101 и ее производных

вать большое число разных штаммов *Streptomyces*.

Важным преимуществом молекулярных векторов на основе SCP2* является возможность клонировать в них большие (до 30 тпн) фрагменты ДНК. В совокупности свойства рассмотренных плазмид делают их весьма перспективными для клонирования оперонов биосинтеза антибиотиков.

Наряду с низкокопийными векторными плазмидами при решении ряда задач необходимо иметь высококопийные клонирующие векторы. Наибольшее число векторов такого типа создано на основе плазмиды pIJ101 (рис. 11.4) — конъюгативной половой плазмиды небольшого размера (8,9 тпн), имеющей широкий круг хозяев среди представителей рода *Streptomyces* и детерминирующей фенотип Ltz$^+$. У *S. lividans* число копий этой плазмиды варьирует в зависимости от штамма от 40 до 300 на бактериальную хромосому.

На основе pIJ101 и ее делеционных производных *in vitro* сконструированы векторы, маркированные рядом детерминант лекарственной устойчивости. В качестве примера рассмотрим плазмиды pIJ350 и pIJ702 (см. рис. 11.4). pIJ350 обеспечивает устойчивость к тиострептону — антибиотику, к которому чувствительно большинство стрептомицетов. Она высококопийна, имеет широкий круг хозяев среди стрептомицетов и неконъюгативна. Для клонирования фрагментов ДНК может использоваться лишь сайт *Pst*I. Более удобный вектор (pIJ702) получен в лаборатории Д. Хопвуда (1983 г.) в результате встройки в pIJ350 фрагмента ДНК, содержащего ген *mel S. antibioticus*. Данная плазмида содержит уже два маркера, причем ген *mel* легко выявляется фенотипически. Более того, в составе гена *mel* имеются единичные участки узнавания рестриктаз B*gl*II, *Sst*I и *Sph*I. У штамма *S. lividans* 66[pIJ702] за счет повышенной дозы генапродуктивность по тирозиназе оказалась в 36 раз больше, чем у клеток, несущих ген *mel* в составе низкокопийных плазмид.

К настоящему времени получено большое число других векторных плазмид стрептомицетов, однако они не имеют принципиальных отличий от рассмотренных выше.

Для молекулярно-генетического исследования стрептомицетов важное значение имеют бифункциональные векторные плазмиды и космиды, способные реплицироваться в клетках *Streptomyces* и *Escherichia coli*. Представительные клонотеки геномной ДНК можно получать в простой генно-инженерной системе *E. coli*, а затем клонированные фрагменты в составе челночного вектора вводить в клетки стрептомицетов и изучать детерминируемые ими функции. Объединением молекулярных векторов *Streptomyces* и *E. coli* получен большой набор челночных производных. В ходе этих исследований обнаружилось, что многие гены *E. coli*, определяющие устойчивость к антибиотикам (например такие, как *cat*, *neo*, *bla*, *tet*), экспрессируются в клетках *Streptomyces*. Следовательно, система экспрессии генов стрептомицетов отличается от таковой грамположительных бактерий рода *Bacillus* (см. 10.3).

Для молекулярного клонирования в стрептомицетах также были разработаны векторы на основе умеренного актинофага ϕC31, обладающего широким кругом хозяев. Данный фаг по своей организации напоминает фаг λ (см. 2.2.2). Геном ϕC31 имеет размер 41 тпн и представляет собой двухцепочечную линейную молекулу ДНК с липкими концами (*cos*). Фаг может лизогенизировать клетки стрептомицетов, интегрируя свой геном по участку *att* в бактериальную хромосому. В ДНК ϕC31 имеется непрерывная область размером 8 тпн, несущественная для литического развития фага. Построены рестрикционные карты ДНК ϕC31 и получены различные векторные производные.

Особый интерес векторная система фага ϕC31 представляет для метода ***мутационного клонирования***. Этот метод разработали К. Чейтер и К. Брутон в 1983 г., использовав в качестве вектора фаг ϕC31, у которого в геноме делетирован участок *att*. Такой фаг способен интегрировать свою ДНК в бактериальную хромосому только за счет клеточной системы общей рекомбинации по областям гомологии. На основе векторного фага может быть создан банк генов любого штамма *Streptomyces*. Гибридными фагами инфицируют клетки и селектируют лизогенные клоны, имеющие нарушения определенного хромосомного гена. Мутация происходит в том случае, когда гибридный фаговый геном интегрируется в целевой ген за счет клонированного в его составе фрагмента хромосомной ДНК. Фаговое потомство мутантных штаммов, образуемое при вырезании профага по фланкирующим гомологичным повторам, содержит в составе генома клонируемые фрагменты. С помощью данного методического приема удается достаточно просто выделять различные гены бактерии-хозяина.

Г. Мит с сотрудниками в 1989 г. предложили модификацию метода мутационного клонирования. В качестве клонирующего вектора в этом случае используют не фаг, а плазмиду с температурочувствительной системой репликации. Обнаружено, что плазмида pSG5, выделенная из *S. ghanaensis*, стабильно наследуется клетками стрептомицетов, культивируемыми при температуре не выше 34 °С. В таких условиях плазмида нормально реплицируется и ее копийность составляет 40–50 молекул на хромосому. При увеличении температуры культивирования выше 36 °С репликация pSG5 ингибируется и плазмида очень быстро утрачивается растущей бактериальной культурой. На основе репликона pSG5 и различных генов лекарственной устойчивости *in vitro* сконструированы векторные плазмиды серии pSG, сохранившие свойства репликона родительской пламиды. Данные векторы-«самоубийцы» с успехом можно использовать для метода мутационного клонирования, при этом они имеют определенные преимущества перед векторами на основе ДНК фага ϕC31. Поскольку плазмиды серии pSG и их гибридные варианты эффективно реплицируются при низкой температуре, то после повышения температуры и прекращения репликации плазмидная ДНК находится в клетке в высокой концентрации, что обеспечивает эффективную рекомбинационную интеграцию гибридной ДНК в хромосому бактерии. Свободные плазмиды очень быстро элиминируются из растущей культуры.

Как видим, для бактерий рода *Streptomyces* создан широкий спектр разнообразных молекулярных векторов, которые позволяют изучать механизмы регуляции функционирования генома, а также отдельных блоков генов, например, генов биосинтеза антибиотиков или генов, детерминирующих процесс дифференцировки клеток *Streptomyces*.

Д. Хопвуд с сотрудниками в 1984 г. клонировали в векторе pIJ922 (см. рис. 11.3), сконструированном на основе низкокопийной плазмиды SCP2* и способном нести вставки ДНК большой протяженности, весь кластер генов *act* штамма *S. coelicolor* A3(2), детерминирующих синтез антибиотика актинородина. Гибридная плазмида pIJ2303 содержала вставку ДНК размером 32,5 тпн, комплементировала все 7 классов мутаций *act* и определяла синтез антибиотика, не отличающегося по физико-химическим свойствам от актинородина. Следует отметить, что pIJ2303 направляла синтез актинородина в самых разных видах *Streptomyces*. При этом в штамме — доноре оперона *act S. coelicolor* A3(2) данная плазмида, несмотря на ее низкую копийность, обусловливала сверхпродукцию антибиотика (в 40 раз выше, чем в исходном штамме).

Возможность клонировать все гены путей биосинтеза определенных антибиотиков позволила реализовать в 1985 г. давнюю мечту исследователей — создавать «гибридные» пути биосинтеза новых антибиотиков за счет совмещения и взаимодействия ферментов, кодируемых разными видами стрептомицетов. Образуемые при этом новые антибиотики принято называть ***гибридными антибиотиками***.

Так, штамм *Streptomyces* sp. AM-7161, образующий медермицин, при введении плазмиды pIJ2303 продуцировал большие количества актинородина и медермицина. Когда этот штамм трансформировали плазмидой pIJ2301, комплементирующей лишь V–VII классы мутантов оперона *act*, синтезировалось новое соединение, названное медерродином А (рис 11.5).

Другая картина наблюдалась при введении плазмиды pIJ2303 с полным набором генов *act* в штамм *S. violaceusruber* Tu22, синтезирующий гранатицин и дигидрогранатицин. При этом образовывался новый гибридный антибиотик дигидрогранатиродин (см. рис. 11.5) и небольшое количество актинородина. Продукция гранатицина и дигидрогранатицина отсутствовала.

Как видим, кроме успешного клонирования всего набора генов, контролирующих синтез

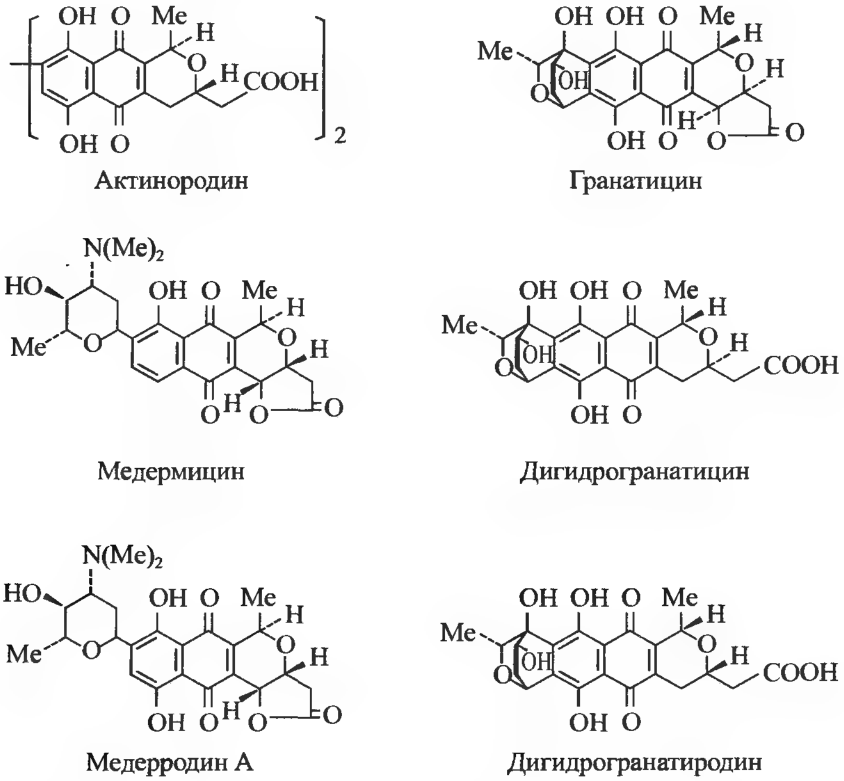


Рис. 11.5. Структура природных и гибридных антибиотиков, синтезируемых стрептомицетами

определенного антибиотика, большое значение имеет штамм *Streptomyces*, в который этот кластер генов будет введен. Следует отметить, что современный уровень знаний и сложность биосинтеза антибиотиков обычно не позволяют точно предсказать итог введения гибридной плазмиды в тот или иной штамм — продуцент антибиотиков. Дальнейшие исследования, по-видимому, позволят осознанно создавать штаммы — продуценты гибридных антибиотиков с заданными свойствами.

Несомненно, *Streptomyces* для генетической инженерии наиболее интересны как продуценты антибиотиков, и особенно гибридных антибиотиков. Однако эти бактерии в ряде случаев могут быть полезны и как хозяева при создании штаммов, продуцирующих целевые белки. Например, можно попытаться создать штамм стрептомицетов, который кроме набора антибиотиков будет синтезировать и секретировать из клеток биологически активный полипептид типа интерферона или интерлейкина. Возможно, полученный на базе такого штамма комплексный препарат будет полезен для ветеринарии и/или медицины.

В связи с этим рассмотрим организацию и функционирование генов стрептомицетов. Прежде всего необходимо отметить, что в клетках стрептомицетов выявлена экспрессия различных генов грамотрицательных бактерий *E. coli*, *Serratia marcescens* и грамположительных бактерий рода *Bacillus*. В то же время большинство промоторов *Streptomyces* не способны нормально функционировать в клетках *E. coli*. Полагают, что в основном это связано с высоким содержанием GC-пар в ДНК *Streptomyces*, в том числе в последовательностях промоторов между областями –35 и –10 и вблизи них.

В штамме *S. coelicolor* A3(2) выявлены две формы РНК-полимеразы, различающиеся σ-фактором. При этом фактор σ^{35} определяет специфичность холофермента *Streptomyces*, схожую с $E\sigma^{70}$ *E. coli* и $E\sigma^{43}$ *B. subtilis* (см. 10.3.1), узнающих основной класс промоторов грамотрицательных и грамположительных бактерий — промоторы *veg*. Однако усредненная структура консервативных районов промоторов *veg Streptomyces* несколько отличается от аналогичных последовательностей промоторов *E. coli* или *B. subtilis*:

	–35	–10
Streptomyces	... TTCACA	... TAGGAT ...
E. coli (*B. subtilis*)	... TTGACA	... TATAAT ...

Второй фактор — σ^{49} — определяет специфичность холофермента стрептомицетов, схожую со специфичностью фермента, узнающего гены споруляции *B. subtilis*.

Для эффективной инициации трансляции необходима высокая степень комплементарности последовательности SD на мРНК и 3′-конца 16S рРНК. Определение последовательности 3′-конца 16S рРНК *S. lividans* 66 показало, что она идентична соответствующему участку 16S рРНК *B. subtilis*. Важной особенностью генов *Streptomyces* является то, что кодон GUG в качестве инициаторного используется в 10 раз чаще, чем в генах *E. coli*.

Вырожденность генетического кода позволяет использовать для всех 20 аминокислот кодоны, имеющие в третьем положении G или C. Для организмов, характеризующихся высоким содержанием в геноме гуанина и цитозина, такие кодоны должны использоваться преимущественно. Именно это наблюдается в изученных генах стрептомицетов, у которых доля G/C в третьем положении кодонов варьирует от 82 до 97 %.

Как видим, организация генов бактерий рода *Streptomyces* имеет целый ряд особенностей, которые необходимо учитывать при попытке экспрессировать в данном микроорганизме чужеродные гены.

11.3. КОРИНЕФОРМНЫЕ БАКТЕРИИ

В группу коринеформных бактерий объединяют разнообразные грамположительные бактерии, широко распространенные в природе. Многие непатогенные почвенные изоляты (*Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Arthrobacter* sp.) используются в промышленности для производства глутаминовой кислоты, лизина и других аминокислот, нуклеотидов, а также в процессах конверсии стероидов. По стоимости микробиологической продукции производство аминокислот уступает только производству антибиотиков. Несмотря на большое практическое значение коринеформных бактерий, их генетика изучена пока слабо, хотя пути биосинтеза аминокислот и способы их регуляции исследованы основательно.

При селекции эффективных продуцентов аминокислот широко применяют аналоги этих соединений. Действуя как ретроингибиторы или корепрессоры, аналоги выключают синтез естественных метаболитов, однако не могут заменить их функционально. Поэтому на минимальной среде с антиметаболитом выживают и образуют колонии лишь те клетки, у которых нарушены механизмы негативной регуляции биосинтеза соответствующей аминокислоты и которые вследствие этого избыточно ее синтезируют. Следует отметить, что устойчивость

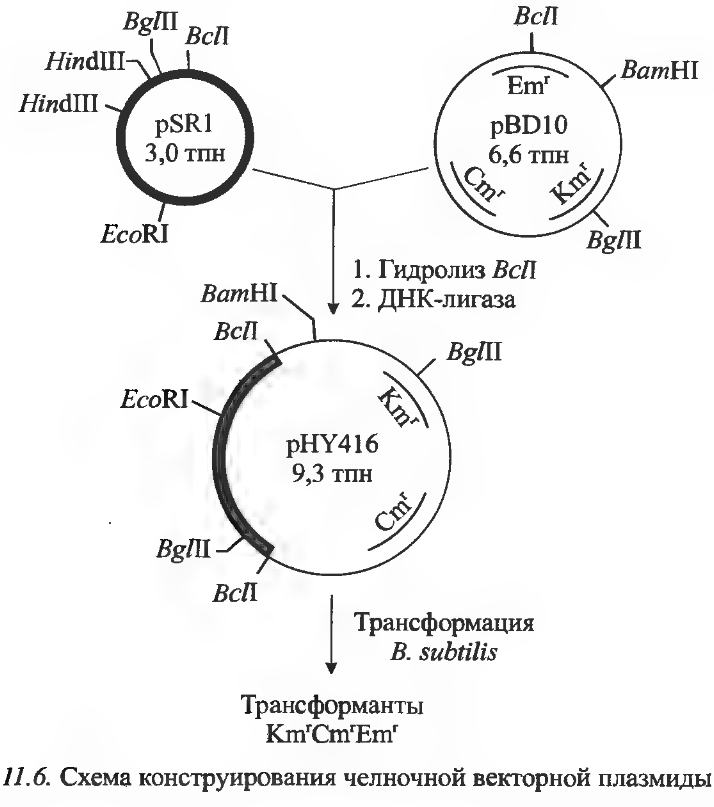


Рис. 11.6. Схема конструирования челночной векторной плазмиды pHY416

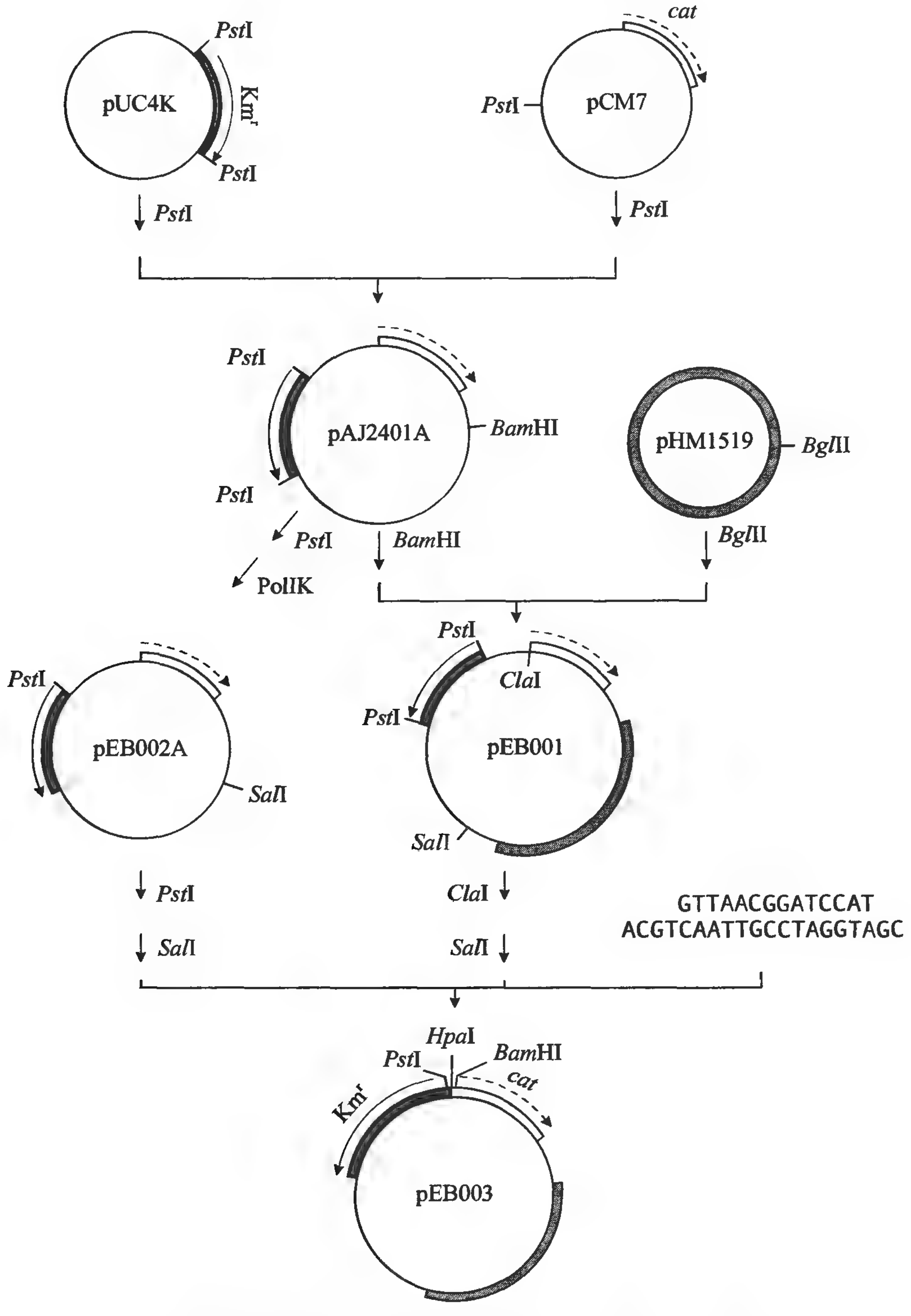


Рис. 11.7. Схема создания челночного вектора для отбора промоторов.

В качестве доноров генетических элементов использованы плазмиды *E. coli* pUC4K (Km^r) и pCM7 (репликон и беспромоторный ген *cat*), а также криптическая плазмида *Corynebacterium glutamicum* pHM1519 (репликон)

к аналогу могут вызывать также мутации, которые просто блокируют его поступление в клетку. Поэтому обычно проводят несколько этапов селекции, используя различные аналоги или повышающиеся концентрации одного и того же аналога. В результате такой селекционной работы удается существенно увеличить продуктивность штаммов по целевому соединению. Однако при данном классическом подходе невозможно получить новые каталитические активности. Такую задачу можно успешно решить лишь методами генетической инженерии.

Принципиальное значение при разработке генно-инженерной системы любого организма

Таблица 11.2. **Экспрессия гена *cat* под контролем промоторов *E. coli* в клетках *B. lactofermentum* и *E. coli***

Плазмида	Промотор	Активность CAT	
		в *B. lactofermentum*	в *E. coli*
pEB003	—	30	0
pEB003TA	p_{tac}	6690	3130
pEB003TR	p_{trp}	290	460
pEB003LA	p_{lacUV5}	230	390

Примечание. Активность хлорамфениколацетилтрансферазы выражена в общепринятых единицах.

имеют создание молекулярных клонирующих векторов и поиск методов генетической трансформации клеток.

На первых порах плазмидную трансформацию коринеформных бактерий осуществляли, используя протопласты клеток. В последующие годы была продемонстрирована возможность применения для этих целей метода электропорации.

Многочисленные попытки вводить разные плазмиды грамположительных и грамотрицательных бактерий не позволили выявить чужеродный репликон, который был бы способен функционировать в коринеформных бактериях, что указывает на узкую специфичность их репликационного ферментного комплекса. Создаваемые клонирующие векторы коринебактерий, как правило, являются челночными плазмидами типа *E. coli* – *C. glutamicum*, *B. subtilis* – *C. glutamicum*, *E. coli* – *B. lactofermentum* и др. Один из первых подобных векторов сконструировали М. Ёшихама с соавторами (1985 г.) на основе клонирующего вектора *B. subtilis* pBD10 и небольшой криптической плазмиды *C. glutamicum* pSR1 (рис. 11.6). Аналогично получены и другие векторные плазмиды.

Изучение экспрессии генов антибиотикоустойчивости челночных плазмид в первых же работах показало, что в клетках *C. glutamicum* эффективно экспрессируются гены грамотрицательной бактерии *E. coli*. Следовательно, коринебактерии по организации генов существенно отличаются от бактерий рода *Bacillus*, так как в последних большинство генов *E. coli* не экспрессируются.

Челночные плазмиды типа *E. coli* – *C. glutamicum* оказались очень удобными для извлечения индивидуальных генов *C. glutamicum*. С этой целью создают клонотеку гибридных плазмид, несущих фрагменты хромосомной ДНК коринебактерии, и данные плазмиды используют для комплементации ауксотрофных мутаций в *E. coli*. Селектированные таким образом гибридные плазмиды затем можно вводить в бактерию-донор и изучать экспрессию клонированного гена в гомологичном окружении. Повышенная доза гена обычно приводит к суперпродукции соответствующего фермента. Так, клонирование гена *pheA* префенатдегидратазы *C. glutamicum* в составе многокопийной плазмиды вызывало 6-кратное увеличение продукции данного фермента, а при клонировании гена *thrA* *C. glutamicum* уровень синтеза гомосериндегидрогеназы возрастал в 20 раз. Схожие результаты получены и для других генов коринеформных бактерий. В некоторых случаях возрастание уровня продукции определенных ферментов, участвующих в биосинтезе аминокислот, приводило к заметному увеличению продуктивности промышленных штаммов *C. glutamicum* по целевым аминокислотам.

Другой бактерией, используемой для промышленного производства аминокислот, является *Brevibacterium lactofermentum*, продуцирующая глутаминовую кислоту. Для нее, как и для *C. glutamicum*, были созданы различные челночные плазмиды, и в их составе клонированы гены ферментов, участвующих в биосинтезе аминокислот. За счет эффекта дозы клонированных генов удалось повысить продуктивность некоторых промышленных штаммов.

Сравнительное изучение организации генов *B. lactofermentum* и *E. coli* привело исследователей к заключению о сходстве структуры промоторов у этих микроорганизмов. Для более подробного анализа Я. Моринага с соавторами (1987 г.) создали челночный вектор pEB003 (рис. 11.7), обеспечивающий возможность селекции промоторсодержащих фрагментов ДНК. Данный вектор позволяет также оценивать относительную силу промоторов. При клонировании в составе pEB003 хорошо изученных в системе *E. coli* промоторов p_{tac}, p_{trp} и p_{lacUV5} выяснилось, что они эффективно функционируют и в *B. lactofermentum* (табл. 11.2). Полученные результаты свидетельствуют о том, что транскрипционный аппарат *B. lactofermentum* организован аналогично аппарату *E. coli*.

В коринеформных бактериях также могут экспрессироваться гены других грамположительных бактерий, например рода *Bacillus*. Так, было показано, что ген α-амилазы *Bacillus amyloliquefaciens* способен экспрессироваться в *Brevibacterium lactofermentum*. Уровень продукции α-амилазы был при этом невысок, но надежно детектировался.

Как видим, перспективы развития генно-инженерной системы коринеформных бактерий весьма широки. Кроме непатогенных промышленных штаммов внимание исследователей при-

влекают коринебактерии, патогенные для растений и животных (наиболее значимым из них является *Corynebacterium diphtheriae* — возбудитель дифтерии). Методы клонирования генов, их направленного мутагенеза и внедрения обратно в геном бактерии (обратная генетика) позволят подробно изучить механизмы патогенного воздействия этих бактерий на организм хозяина.

НЕКОТОРЫЕ ПРОБЛЕМЫ, ВОЗНИКАЮЩИЕ ПРИ СИНТЕЗЕ В БАКТЕРИЯХ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

Впечатляющие успехи генетической инженерии прокариот открывают перспективы создания высокопродуктивных микробиологических технологий, позволяющих получать различные прокариотические и эукариотические белки. Особое внимание исследователей привлекают белки животного происхождения, имеющие значение для медицины и ветеринарии. В подавляющем большинстве случаев эти белки из природных объектов доступны лишь в ограниченных количествах. Поэтому важной задачей является создание эффективных продуцентов таких белков. Многочисленные эксперименты, выполненные на различных бактериальных хозяевах, со всей очевидностью продемонстрировали возможности направленного конструирования бактериальных штаммов — суперпродуцентов эукариотических полипептидов. Однако после первых же успехов перед исследователями встал вопрос о том, в какой степени синтезируемые в прокариотической клетке белки человека и животных соответствуют природным вариантам. Данный вопрос не только представляет общебиологический интерес, но и чрезвычайно важен для практики медицины и ветеринарии. Введение в организм синтезированных в бактериях белков, имеющих даже небольшие отличия от природных форм, может вызывать нежелательные последствия (например развитие аутоиммунных реакций). Поэтому в настоящее время принята концепция, согласно которой полипептид, полученный генно-инженерными методами и предназначенный для медицинского или ветеринарного использования, должен в максимальной степени соответствовать природному белку.

В силу того что генно-инженерная система *E. coli* изучена особенно подробно, именно для этой бактерии накоплена наибольшая информация о структуре синтезируемых чужеродных полипептидов.

Сверхсинтез подавляющего большинства чужеродных белков приводит к формированию в клетках *E. coli* телец включения (см. 3.4). Причем образование включений в значительной мере определяется свойствами белка и уровнем экспрессии клонированных генов. Как правило, при сравнительно низком уровне продукции (0,01–0,1 % суммарного клеточного белка) чужеродный белок растворим в цитоплазме клеток *E. coli*. При увеличении продукции (до 5 % суммарного клеточного белка) обнаруживаются как растворимые, так и нерастворимые формы белка, а при дальнейшем возрастании уровня синтеза практически весь генно-инженерный белок переходит в водонерастворимое состояние.

При формировании водонерастворимых белковых включений важную роль играют гидрофобные взаимодействия молекул. Известно, что многие природные эукариотические белки гликозилированы. Гидрофильный углеводный компонент снижает гидрофобность зрелого белка. В бактериальных клетках отсутствует система гликозилирования белков, поэтому синтезируемые в них эукариотические полипептиды более гидрофобны, чем их природные варианты, а следовательно, обладают сниженной растворимостью и формируют тельца включения. Важно подчеркнуть, что белок, лишенный гликозильной части, как правило, не утрачивает биологической активности и специфичности действия, однако становится менее стабильным, более чувствительным к атаке протеазами и т. п. Какие последствия может иметь использование негликозилированного варианта эукариотического белка в медицине, пока не ясно.

Другой причиной формирования белковых телец включения является образование аномальных межмолекулярных дисульфидных связей. Внутриклеточные белки *E. coli* характеризуются низким содержанием остатков цистеина и малым числом дисульфидных связей по сравнению с эукариотическими белками. Восстановительно-окислительные потенциалы бактериальных и эукариотических клеток различаются, и это может приводить к неправильному образованию дисульфидных связей в эукариотических полипептидах, продуцируемых клетками бактерий. Наиболее полно этот вопрос изучен на модели интерферона $\alpha 2$ человека. В норме данный белок содержит 4 остатка цистеина (в положениях 1, 29, 98 и 138), которые образуют две внутримолекулярные дисульфидные связи: 1–98 и 29–138. Природный интерферон всегда мономерный. У генно-инженерного белка, синтезированного в *E. coli*, обнаруживаются как аномальные внутримолекулярные дисульфидные связи (например 1–29, 98–138 и др.) и свободные SH-группы, так и межмолекулярные S–S-связи. Последние вызывают формирование димеров, тримеров и мультимеров более высокого порядка, обладающих, как и мономеры, значительной внутримолекулярной гетерогенностью.

В ряде случаев смена бактерии-хозяина способствует увеличению выхода растворимого генно-инженерного белка, несмотря на то, что уровень экспрессии клонированного гена практически остается без изменений. А. Я. Стронгин с соавторами (1988 г.) показали, что экспрессия генов α-интерферонов человека в клетках *Pseudomonas sp.* приводит к накоплению целевых белков в растворимом состоянии, в то время как в *E. coli* бо́льшая часть чужеродного белка образует тельца включения. Авторы полагают,

что такой результат обусловлен различием восстановительно-окислительных потенциалов цитоплазмы клеток *E. coli* и *Pseudomonas sp.*

Помимо суперпродукции, повышенной гидрофобности и неправильного образования дисульфидных связей формированию водонерастворимых конгломератов чужеродных белков в *E. coli* способствуют и другие факторы, которые пока точно не известны. Однако совершенно ясно, что в нерастворимых включениях белок, по крайней мере частично, денатурирован, а для его перевода в растворимую форму требуется полная денатурация с разрушением дисульфидных связей. Для растворения белковых телец включения их обрабатывают в жестких денатурирующих условиях додецилсульфатом натрия, гуанидингидрохлоридом, мочевиной и т. п. с добавлением 2-меркаптоэтанола, дитиотреитола и др. Заключительным этапом очистки таких белков является их ренатурация, необходимая для получения функционально активного продукта. Удельная активность ренатурированного генно-инженерного белка при этом часто не достигает уровня, свойственного природной форме. Получаемый таким образом препарат содержит балласт в виде измененных форм целевого белка, который может вызывать негативные эффекты при попадании в организм человека или животных. Поэтому при конструировании бактериальных штаммов — продуцентов эукариотических белков медицинского назначения необходимо стремиться к получению целевого белка в растворимом виде и не допускать его преципитации. Наиболее просто добиться высокого уровня продукции эукариотического белка без формирования телец включения можно, создавая штаммы, секретирующие этот белок в окружающую среду. Продуктивен также подход с использованием экспрессирующих векторов широкого круга хозяев и последовательным введением полученных на их основе гибридных плазмид в разные бактерии для поиска оптимальной пары.

Предотвращение образования телец включения позволяет избежать денатурации чужеродного белка, но не решает многих других проблем. Как уже упоминалось, эукариотические полипептиды в клетках бактерий не гликозилируются. Они не могут подвергаться в бактериях и многим другим типам посттрансляционной модификации: ацилированию, фосфорилированию, амидированию С-концевой аминокислоты, дезамидированию, метилированию и т. д.

Важной особенностью эукариотических белков является то, что у них отсутствует N-концевой остаток инициаторного метионина. В бактериальных же клетках далеко не у всех зрелых форм белков удален N-концевой Met. Так, у *E. coli* метионинаминопептидаза характеризуется узкой субстратной специфичностью, и ее активность существенно зависит от природы остатка, следующего за N-концевым Met. Данная аминопептидаза эффективно отщепляет метионин, если рядом с ним находятся глицин, аланин или пролин. Метионин практически не отщепляется, если во втором положении находятся остатки фенилаланина, лейцина, метионина, глутаминовой кислоты, аргинина и лизина. Таким образом, по крайней мере в ряде случаев, у эукариотических белков, синтезированных в бактериальных клетках, не будет процессироваться N-концевой остаток метионина. Наиболее просто данное затруднение удается преодолевать при создании конструкции, обеспечивающей секрецию целевого белка из клетки.

Многочисленные эукариотические белки синтезируются в виде предшественников, которые «укладываются» в определенную пространственную структуру, а затем подвергаются сложному процессингу. В бактериальной клетке такие варианты процессинга реализовать невозможно, поэтому конструируют искусственные гены, детерминирующие прямой синтез аминокислотной последовательности зрелой формы соответствующего белка. Даже если при этом синтезируется биологически активный полипептид, он может отличаться от природной формы деталями своей архитектуры, значение которых нам в большинстве случаев не известно.

Таким образом, в результате синтеза эукариотических белков в прокариотических клетках чаще всего образуются продукты, отличающиеся от природных вариантов этих белков, даже если основные функции целевого белка сохранены. Поэтому бактериальные штаммы-продуценты малоперспективны для создания инъекционных лекарственных препаратов.

Наибольшего успеха в синтезе нативных эукариотических белков можно ожидать при использовании эукариотических клеток для экспрессии чужеродных генов. Несмотря на то что эти экспериментальные системы сложнее бактериальных, они в последние годы все чаще используются при решении задач генно-инженерной продукции биологически активных эукариотических белков. Следующие главы будут посвящены знакомству с разными типами эукариотических векторных систем.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Биотехнология: Учеб. пособие для вузов. В 8 кн. / Под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. Кн. 2. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов / В. Г. Дебабов, В. А. Лившиц. М.: Высш. шк., 1988. 208 с.

Орехов А. В., Ломовская Н. Д. Актиномицеты — объекты генно-инженерных исследований // Генетика. 1987. Т. 22. С. 2593–2605.

Стронгин А. Я. Молекулярно-биологические основы структурно-функциональных особенностей белков — продуктов гетерологичного микробного синтеза // Генетика промышленных микроорганизмов и биотехнология. М.: Наука, 1990. С. 240–256.

Хантер А. С. Клонирование генов в стрептомицетах // Клонирование ДНК. Методы / Под ред. Д. Гловера. М.: Мир, 1988. С. 251–284.

Ali N. A., Dale J. W. Secretion by *Streptomyces lividans* of a cloned gram-negative β-lactamase // FEMS Microbiol. Lett. 1986. Vol. 33. P. 277–280.

Batt C. A., Follettie M. T., Shin H. K. et al. Genetic engineering of coryneform bacteria // Trends Biotechnol. 1985. Vol. 3. P. 305–310.

Clewell D. B. Plasmids, drug resistance, and gene transfer in the genus *Streptococcus* // Microbiol. Rev. 1981. Vol. 45. P. 409–436.

Hill R. T., Illing N., Kirby R., Woods D. R. Development of pLR591, a *Streptomyces – Escherichia coli* positive selection shuttle vector // FEMS Microbiol. Lett. 1989. Vol. 57. P. 223–226.

Hopwood D. A., Malparida F., Kieser H. M. et al. Production of «hybrid» antibiotics by genetic engineering // Nature. 1985. Vol. 314. P. 642–644.

Kondo J. K., McKay L. L. Gene transfer systems and molecular cloning in group N Streptococci: A review // J. Dairy Sci. 1985. Vol. 68. P. 2143–2159.

Morinaga Y., Tsuchiya M., Miwa K., Sano K. Expression of *Escherichia coli* promoters in *Brevibacterium lactofermentum* using the shuttle vector pEB003 // J. Biotechnol. 1987. Vol. 5. P. 305–312.

Munoz A., Perez-Aranda A., Barbero J. L. Cloning and expression of human interleukin 2 in *Streptomyces lividans* using the *Escherichia coli* consensus promoter // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1985. Vol. 133. P. 511–519.

Van der Vossen J. M. B. M., Kok J., Venema G. Construction of cloning, promoter-screening, and terminator-screening shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Streptococcus lactic* // Appl. Envir. Microbiol. 1985. Vol. 50. P. 540–542.

Yoshihama M., Higashiro K., Rao E. A. et al. Cloning vector system for *Corynebacterium glutamicum* // J. Bacteriol. 1985. Vol. 162. P. 591–597.

Глава 12
ГЕННО-ИНЖЕНЕРНАЯ СИСТЕМА ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Дрожжи-сахаромицеты (*Saccharomyces cerevisiae*) входят в число излюбленных объектов экспериментальной биологии. Данный низший эукариотический организм удобен в работе, имеет относительно небольшой геном и прекрасно изучен генетически и биохимически. Дрожжи обладают многими свойствами, характерными для клеток высших эукариот, и поэтому рассматриваются как экономически наиболее выгодная эукариотическая система для продукции белков человека и животных. Кроме того, благодаря относительной простоте своей организации дрожжи являются замечательной лабораторной моделью, позволяющей изучать на молекулярном уровне такие фундаментальные биологические процессы, как митоз, мейоз, секреция и посттрансляционная модификация белков и др.

Важная особенность пекарских дрожжей *S. cerevisiae* — их полная безопасность для человека и животных, что имеет большое значение при создании методами генетической инженерии продуцентов белков, предназначенных для фармацевтического использования. При этом следует отметить, что дрожжи давно используются в микробиологической промышленности.

В клетках дрожжей удается синтезировать белки высших эукариот, в гораздо большей степени соответствующие природным формам, чем белки, получаемые в бактериальных системах. Более того, некоторые полипептиды, которые не удается синтезировать в бактериях, успешно продуцируются клетками дрожжей.

Важное направление исследований открывает также возможность введения мутаций в клонированные дрожжевые гены с последующей встройкой таких генов в нормальные положения генома для изучения влияния мутаций на функции генов. Такая «обратная генетика» имеет большое значение для тонкого молекулярно-генетического познания *S. cerevisiae*, а также изучения организации и функционирования генетических элементов эукариот в целом.

12.1. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ДРОЖЖЕЙ-САХАРОМИЦЕТОВ

Пекарские дрожжи *S. cerevisiae* являются наиболее изученными в биохимическом и генетическом плане эукариотическими организмами. Это обусловлено тем, что для них применимо большинство методов, разработанных для манипуляций с бактериальными культурами. Дрожжи можно выращивать на простых питательных средах, в том числе агаризованных, в обычной бактериологической посуде и с использованием стандартного бактериологического оборудования. Методология работ с культурами клеток животных и растений существенно сложнее, и при этом необходимы специальные дорогостоящие питательные среды и оборудование. Кроме простоты культивирования дрожжи характеризуются высокой скоростью размножения и наличием небольшого числа стадий в цикле развития, смена которых легко контролируется в эксперименте. Будучи типичными эукариотами, дрожжевые клетки представляют собой удобную модель для изучения молекулярных основ наследственности и изменчивости высших организмов. Кроме того, дрожжи являются важнейшим производственным микроорганизмом, используемым в хлебопечении, приготовлении вина и пива. Большое внимание дрожжи привлекли к себе как объекты генно-инженерных экспериментов, направленных на создание высокоэффективных технологий биосинтеза различных белков высших эукариот.

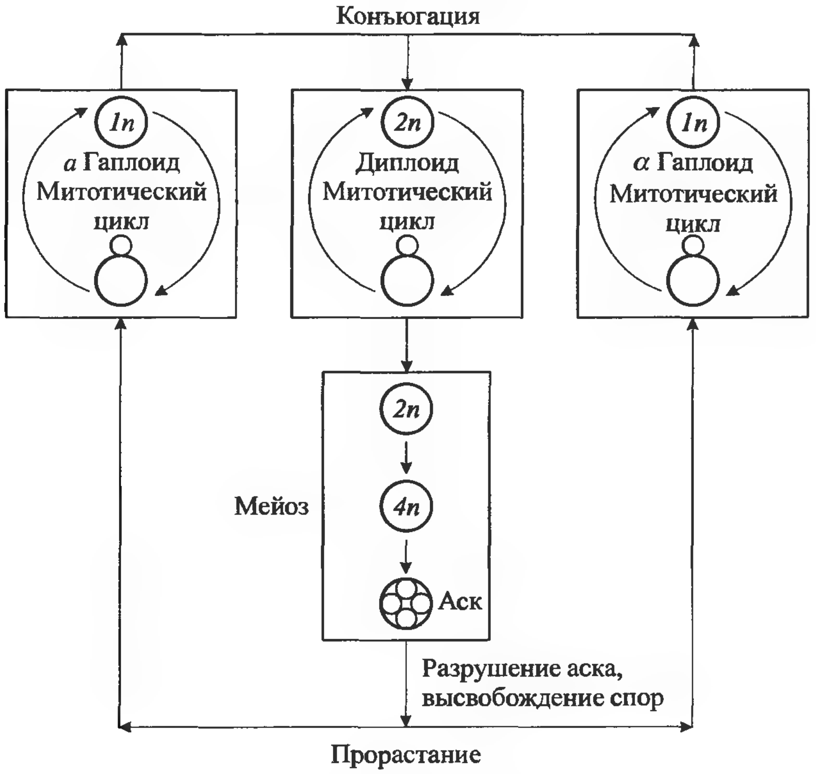


Рис. 12.1. Жизненный цикл *Saccharomyces cerevisiae*

У дрожжей-сахаромицетов подробно изучен клеточный цикл развития (рис. 12.1). Клетки *S. cerevisiae* делятся почкованием. Вегетативные клетки штаммов, выделяемых из природных образцов или используемых в производстве, как правило, диплоидны. При определенных условиях в них происходит мейоз, и диплоидная клетка превращается в аск с четырьмя гаплоидными аскоспорами, окруженными общей оболочкой. Эти структуры называют тетрадами. (В лабораторных условиях споруляцию инициируют перенесением диплоидных клеток в среду, содержащую ацетат натрия.) Оболочку аска можно разрушить механически или ферментативно и с помощью микроманипулятора при наблюдении в микроскоп разъединить аскоспоры. После прорастания каждая спора дает начало отдельному гаплоидному клону со специфическим генотипом и фенотипом. Данный подход, называемый ***тетрадным анализом***, позволяет методически просто выяснять, локализован ли изучаемый генетический маркер на хромосоме или он входит в состав внехромосомных генетических элементов. Хромосомные гены дают картину расщепления в соответствии с классическими законами генетики, а внехромосомные признаки, как правило, не расщепляются в мейозе.

Одно из преимуществ *S. cerevisiae* как экспериментальной системы — простота и надежность ее генетического анализа. Дрожжевые штаммы могут существовать как стабильные гаплоиды, что значительно упрощает, по сравнению с большинством диплоидных эукариотических систем, получение мутантов. Так как диплоидные штаммы также генетически стабильны, легко выяснить, является ли определенная мутация доминантной или рецессивной, и классифицировать мутанты со схожим фенотипом по группам комплементации.

Большинство гаплоидных лабораторных штаммов *S. cerevisiae* стабильно экспрессируют один из двух генов, кодирующих половые феромоны и определяющих противоположные типы спаривания, которые принято обозначать *α* и *a*. При отсутствии клеток противоположного типа спаривания гаплоидные штаммы делятся почкованием. Если же клетки гаплоидных штаммов противоположных типов спаривания смешать, то образуются клетки с диплоидным ядром.

В результате получения и характеризации большого числа мутантных штаммов и выполненного с их помощью генетического анализа удалось распределить более 400 генов *S. cerevisiae* по 16 группам сцепления и составить подробную генетическую карту.

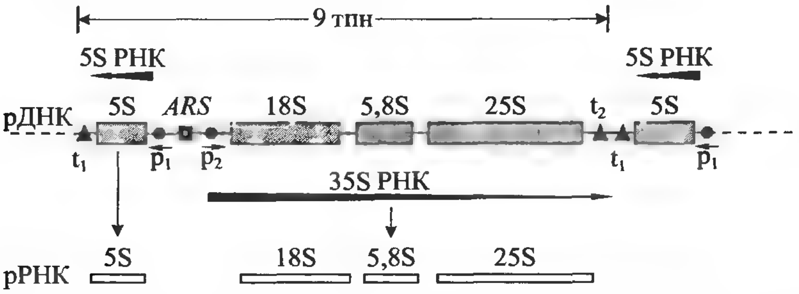


Рис. 12.2. Организация повторяющейся единицы генов рРНК *S. cerevisiae*.

p_1, p_2 — промоторы, с которых инициируется транскрипция соответственно 5S рРНК и 35S РНК — предшественника трех классов рРНК; t_1 и t_2 — терминаторы транскрипции рибосомных оперонов; *ARS* — область начала репликации ДНК. Направление транскрипции показано стрелками

Гаплоидная клетка дрожжей *S. cerevisiae* содержит 16 линейных хромосом, каждая из которых представлена индивидуальной молекулой ДНК, упакованной в нуклеосомы. Размер хромосом у дрожжей-сахаромицетов значительно меньше, чем у высших эукариот, и находится в интервале от 250 до 2200 тпн. Это позволяет разделить дрожжевые хромосомы методом пульс-электрофореза (см. 1.11). Суммарное содержание ДНК в гаплоидном ядре дрожжей (около 12 млн пн) лишь в 3 раза превышает содержание ДНК в клетках бактерии *E. coli* (4639 тпн). У большинства других эукариот размер генома больше, чем у *S. cerevisiae*, по крайней мере в 1000 раз.

Относительно небольшой размер генома у дрожжей объясняется низким содержанием в их ДНК повторяющихся последовательностей. Основным классом многократно повторяющихся последовательностей ДНК у *S. cerevisiae* является кластер генов рибосомной РНК, локализованный на хромосоме XII. На гаплоидную клетку приходится 100–140 копий тандемно повторяющихся единиц генов рРНК. В состав каждой такой единицы длиной 9 тпн входят четыре гена, кодирующих 25S, 18S, 5,8S и 5S рРНК (рис. 12.2). Рибосомные РНК с константами седиментации 5,8S, 18S и 25S образуются из общего высокомолекулярного предшественника — 35S РНК; 5S рРНК транскрибируется независимо и с другой цепи ДНК. Показано, что в повторяющейся единице генов рРНК присутствует область начала репликации ДНК.

По GC-составу гены рРНК отличаются от суммарной хромосомной ДНК дрожжей. Поэтому в градиенте плотности хлорида цезия ДНК, кодирующая рибосомную РНК, образует индивидуальную полосу с плавучей плотностью $\rho = 1{,}705$ г/см^3, в то время как остальная хромосомная ДНК выявляется в полосе с $\rho = 1{,}699$ г/см^3.

Дрожжевые клетки, подобно другим эукариотам, содержат митохондрии и митохондриальную ДНК (мтДНК). Молекула митохондриальной ДНК *S. cerevisiae* имеет кольцевую форму с контурной длиной около 25 мкм. Так как 1 мкм двухцепочечной ДНК приблизительно соответствует 2 МДа (или 3 тпн), масса этой кольцевой ДНК составляет около 50 МДа. В зависимости от штамма и условий культивирования на гаплоидную клетку дрожжей приходится от 10 до 40 копий мтДНК. Молекулярно-генетическая структура мтДНК *S. cerevisiae* изучена очень подробно. В отличие от хромосомной ДНК мтДНК не связана с гистонами, и для ее репликации не требуются продукты некоторых генов, необходимые для репликации хромосомной ДНК.

Генетические элементы у дрожжей обозначаются иначе, чем у бактерий:

- гены обозначают тремя латинскими буквами, входящими в название функции, контролируемой данным геном;
- генетические локусы обозначают цифрами, которые пишут непосредственно после трехбуквенного обозначения гена;
- доминантные и рецессивные варианты генов обозначают соответственно прописными или строчными буквами, например *ARG2*/*arg2*;
- фенотипы обозначают тремя латинскими буквами (первая буква прописная, остальные строчные), причем к обозначению дикого фенотипа добавляют знак «+», мутантного фенотипа — знак «–», например, Arg^+, Arg^-.

12.2. ПЛАЗМИДЫ *S. CEREVISIAE*

В 1967 г. Дж. Синклэйр с соавторами опубликовали статью, в которой сообщили, что при электронно-микроскопическом анализе препарата общей дрожжевой ДНК выявляется кольцевая двухцепочечная ДНК с контурной длиной около 2 мкм. Дальнейшие исследования в разных лабораториях показали, что большинство (около 75 %) лабораторных штаммов *S. cerevisiae* содержат этот класс внехромосомных молекул ДНК. Обнаруженная кольцевая ДНК была названа двухмикронной (2μ) плазмидой, а в дальнейшем — Scp1.

На гаплоидную клетку приходится в зависимости от штамма от 30 до 200 копий Scp1. Плавучая плотность Scp1 в градиенте концентрации хлорида цезия такая же, как и у хромосомной ДНК. Данная плазмида является криптической и обнаруживается лишь физико-химически, т. е. выделением плазмидной ДНК. Функции Scp1 в клетках дрожжей пока не выяснены. Так как фенотипически нормальные дрожжевые штаммы могут не содержать Scp1, сделано заключение, что данная плазмида не кодирует жизненно важных функций клетки. Наличие в штамме *S. cerevisiae* плазмиды Scp1 принято обозначать cir^+, а отсутствие — cir^0.

Разными методами доказано, что молекулы Scp1 локализованы в ядре дрожжевой клетки, однако не удалось обнаружить ни одной интегрированной копии Scp1 в хромосомной ДНК дрожжей. Небольшая часть молекул данной плазмиды может находиться в форме димеров, тримеров и др. Scp1 упакована гистонами и транскрибируется в поли(А)-содержащие матричные РНК. Репликация дрожжевой плазмиды происходит в S-фазе клеточного цикла и требует функции тех же генов, что и репликация хромосом.

Исследование структуры Scp1 привело к заключению, что данная плазмида содержит два инвертированных повтора IR1 и IR2 (от англ. inverted repeat sequences), которые разделены уникальными протяженными сегментами ДНК: большим — L (large) и малым — S (small). Выяснилось, что каждая клетка содержит два типа молекул Scp1, которые различаются взаимной ориентацией L- и S-сегментов (рис. 12.3). Каждый тип молекул Scp1 имеет специфический набор рестрикционных участков. Так, после обработки препарата ДНК Scp1 рестриктазой *Eco*RI образуется четыре фрагмента. Суммы размеров фрагментов 1, 4 и 2, 3 равны и соответствуют размеру плазмидной молекулы. Поэтому выявленные изоформы Scp1 иногда обозначают как тип 23 и тип 14; чаще употребляют обозначения «форма А» и «форма В» соответственно. На карте ДНК плазмиды Scp1 за нулевую точку принят сайт *R*1 рестриктазы *Eco*RI (см. рис. 12.3), отсчет нуклеотидов ведется по часовой стрелке. IR-последовательность, ближайшая к *R*1-участку, обозначается IR2, а другой идентичный повтор — IR1. В обеих формах Scp1 нумерация IR-сегментов остается одной и той же.

В 1980 г. Дж. Хартлей и Дж. Донельсон расшифровали последовательность нуклеотидов Scp1. Оказалось, что она состоит из 6318 пн и содержит два идентичных инвертированных повтора длиной 599 пн. L- и S-сегменты имеют размеры 2774 и 2346 пн соответственно. Молекулы плазмид подвергаются сайтспецифической рекомбинации по IR-участкам, в результате чего клетка содержит приблизительно эквимолярные количества изомерных форм. Исходя из функционального анализа и нуклеотидной последовательности на Scp1 картированы четыре гена — *FLP*, *REP*1, *REP*2 и *RAF*, белковые

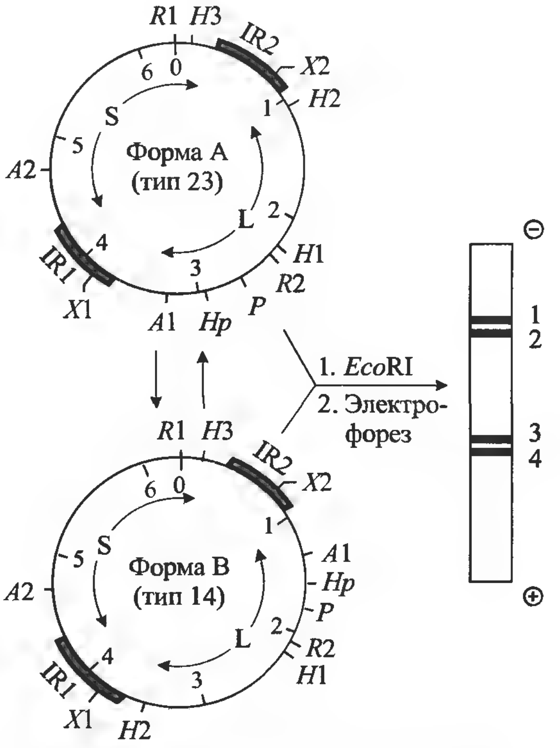


Рис. 12.3. Структура двух форм плазмиды Scp1 *S. cerevisiae*.

Сайты расщепления рестриктазами: *R*1, *R*2 — *Eco*RI; *H*1, *H*2, *H*3 — *Hin*dIII; *A*1, *A*2 — *Ava*I; *P* — *Pst*I; *Hp* — HpaI; *X*1, *X*2 — *Xba*I. Цифры внутри круга обозначают расстояние (тпн) от *R*1 по часовой стрелке

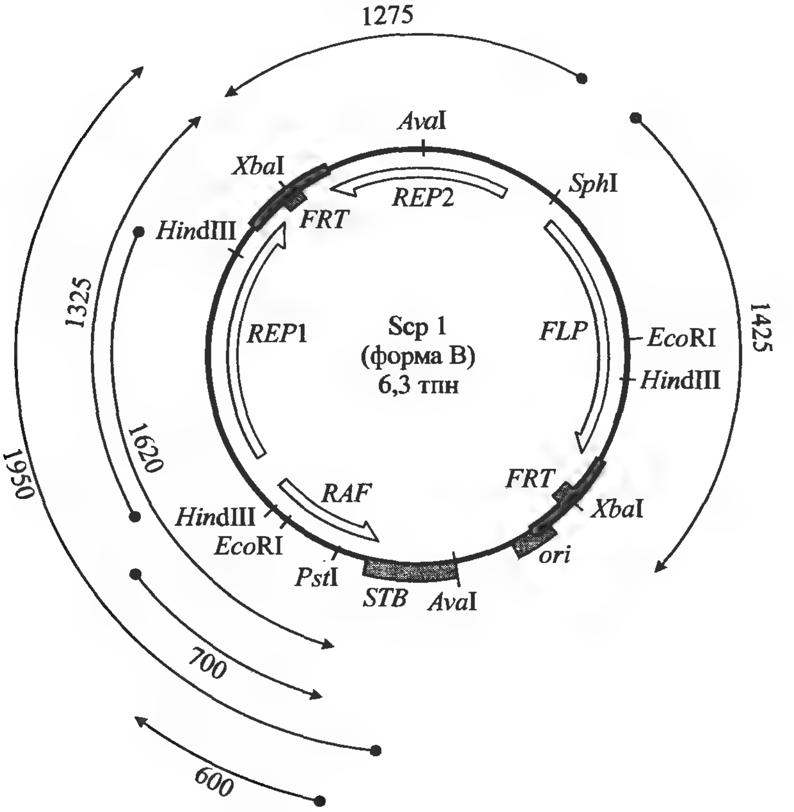


Рис. 12.4. Транскрипционная и генетическая карта плазмиды Scp1.

Транскрипты обозначены стрелками снаружи круга, цифры указывают размер (пн). Заштрихованными блоками отмечены *цис*-действующие генетические элементы плазмиды, черными — районы IR1 и IR2

продукты которых участвуют в поддержании данной плазмиды (рис. 12.4). Кроме этих генов выявлены три *цис*-действующих локуса: *ori*, *STB* и *FRT*.

Репликация плазмиды Scp1 инициируется клеточными ферментами одновременно с репликацией хромосомной ДНК и осуществляется один раз в течение S-фазы клеточного цикла. Уровень амплификации плазмиды при этом регулируется плазмидными генами. Белковый продукт гена *FLP* (от англ. «flip-flop» interconversion of Scp1) связывается с участками *FRT* (*FLP* recombination targets), расположенными в инвертированных повторах, и обусловливает внутримолекулярную рекомбинацию. Это приводит к «переброске» одной из вилок двунаправленной репликации плазмиды, в результате чего возникают две вилки репликации, движущиеся в одну сторону (рис. 12.5), что приводит к мультипликации плазмиды. После акта повторной внутримолекулярной сайтспецифической рекомбинации вилки репликации вновь направляются навстречу друг другу, происходит их встреча и терминация репликации. Мультимер после дополнительной внутримолекулярной рекомбинации распадается на мономеры. По такому необычному механизму достигается амплификация плазмиды Scp1, благодаря чему она поддерживается в многокопийном состоянии.

Практически вся совокупность генов Scp1 направлена на регулирование уровня амплификации и на правильное распределение плазмидных молекул между клетками при делении. Эффективность внутримолекулярной рекомбинации зависит от концентрации белка FLP, так как каждый участок *FRT* (рис. 12.6) состоит из трех повторов длиной 13 пн, окружающих спейсерный участок размером 8 пн (в его состав входит *Xba*I-сайт). Полагают, что с каждым 13-мерным повтором взаимодействует одна молекула белка FLP. В спейсере, по-видимому, происходит расщепление нитей ДНК с образованием одноцепочечных концов и последующим воссоединением их в новой комбинации. (В промежуточном комплексе после расщепления ДНК молекулы белка FLP ковалентно связываются с образующимися после разрыва 3′-концевыми нуклеотидами.)

Важную регуляторную роль в экспрессии генов плазмиды Scp1 играют продукты генов *REP*1 и *REP*2. Белки REP1 и REP2, взаимодействуя друг с другом, формируют активный комплекс (рис. 12.7, *а*), который затем связывается

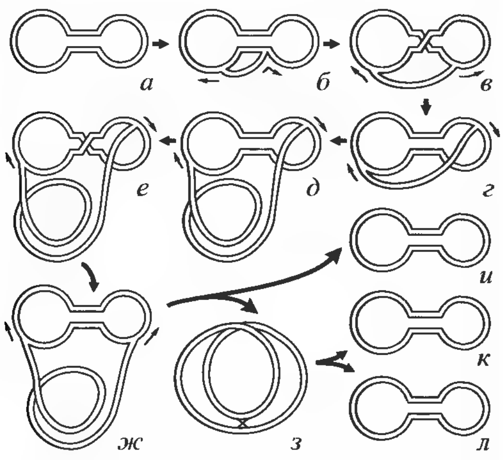


Рис. 12.5. Модель Фючера репликационно-рекомбинационной амплификации плазмиды Scp1 (на примере одноактной апмлификации):

а–л — различные этапы репликации плазмиды. Тонкими стрелками отмечено направление движения вилок репликации. IR-районы плазмиды изображены сближенными параллельными прямыми элементами. FLP-зависимая рекомбинация (*в–г*, *е–ж*) меняет взаимную ориентацию вилок репликации; *з* — внутримолекулярная рекомбинация мультимерной плазмиды

в иерархическом порядке со специфичными участками и ингибирует транскрипцию генов *RAF*, *FLP* и *REP*1. Комплекс REP1–REP2, по-видимому, взаимодействует с последовательностью ДНК 5′ TGCATTTTT 3′, которая найдена перед геном *REP*1, дважды повторена перед геном *FLP* и пять раз — на *STB*. Схожая последовательность 5′ TGCATTTTC 3′ обнаружена также около *FRT* в инвертированных повторах. Учитывая число повторов этой последовательности в разных участках Scp1, можно определить иерархию связывания комплекса REP1 REP2 следующим образом:

STB > *FLP* > *REP*1 > *FRT*.

При этом нужно иметь в виду, что связывание комплекса с последовательностями-мишенями происходит случайным образом и в зависимости от его концентрации с определенной вероятностью может произойти на любом из отмеченных нонануклеотидных участков. По истечении некоторого времени сформировавшиеся на индивидуальных молекулах плазмиды комплексы ДНК–белок распадаются, а затем формируются новые, т. е. система находится в постоянном «движении».

Важной особенностью белкового комплекса REP1–REP2 является то, что С-конец белка REP1 гомологичен кариоскелетным компонентам. Таким образом, этот комплекс способен одновременно связываться с плазмидой на участке *STB* и с ядерной мембраной (см. рис. 12.7, *б*), тем самым обеспечивая распределение плазмидных молекул между делящимися клетками. (Следует подчеркнуть, что, в отличие от клеток животных, в дрожжах ядерная мембрана в процессе клеточного деления остается в основном интактной.)

Связывание комплекса с участком *STB* на плазмиде Scp1 подавляет транскрипцию гена *RAF* (от англ. REP antagonizing factor), продукт которого является антагонистом репрессии транскрипции гена *FLP* комплексом REP1–REP2 (см. рис. 12.7, *а*). Таким образом, от соотношения концентраций белков RAF и REP1–REP2 зависит уровень экспрессии гена *FLP*.

Когда концентрация комплекса REP1–REP2 достаточно высока, транскрипция гена *REP*1 будет репрессирована, что приведет к снижению концентрации данного комплекса, т. е. наблюдается авторегуляция экспрессии гена *REP*1. При очень высокой концентрации комплекса REP1–REP2, обусловленной большой копийностью Scp1, возможно его связывание около участка *FRT* и физическое блокирование процесса внутримолекулярной рекомбинации, что повлечет за собой репрессию амплификации плазмиды.

Плазмида Scp1 является прекрасной модельной системой для изучения контроля экспрессии эукариотических генов и репликации хромосом. Зная молекулярно-биологическую организацию данной плазмиды, можно эффективно использовать ее для создания молекулярных векторов, последующего конструирования гибридных ДНК и введения их в клетки дрожжей.

Спейсер

*Xba*I

5′ … GCTTTGAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTC TCTAGAAA GTATAGGAACTTCAGAG … 3′

3′ … CGAAACTTCAAGGATAAGGCTTCAAGGATAAG AGATCTTT CATATCCTTGAAGTCTC … 5′

Рис. 12.6. Последовательность нуклеотидов плазмиды Scp1 в участке связывания (*FRT*) с белком FLP.

Точками отмечены места контакта молекул белка FLP с ДНК, треугольниками — места гидролиза цепей в спейсерном участке. Стрелками обозначены повторяющиеся последовательности

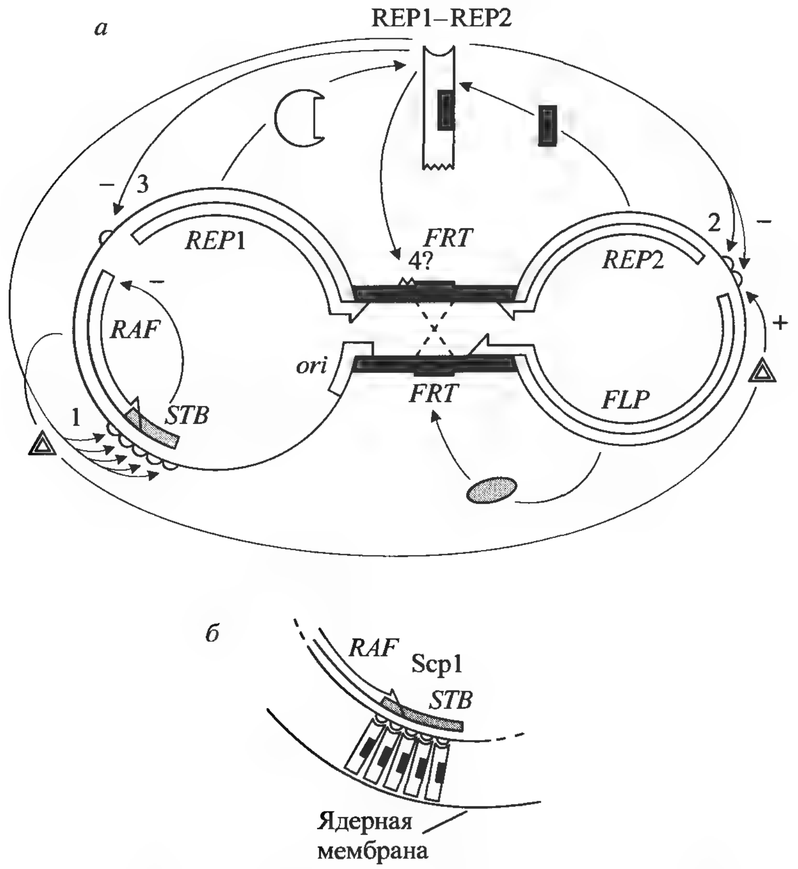


Рис. 12.7. Модель авторегуляции копийности плазмиды Scp1 (*а*) и ее связывания с ядерной мембраной дрожжей-сахаромицетов (*б*).
Цифрами (*а*) обозначена иерархия взаимодействия комплекса REP1–REP2

Дж. Мейеринк с соавторами в 1979 г. обнаружили, что в ядре клеток дрожжей-сахаромицетов находится небольшое число молекул кольцевой двухцепочечной ДНК с контурной длиной около 3 мкм. Как выяснилось, данная плазмида представляет собой автономно реплицирующуюся полную копию одного хромосомного набора генов рибосомной РНК (см. рис. 12.2). В зависимости от штамма *S. cerevisiae* плазмида 3μ присутствует в ядре в количестве от 1 до 19 копий. Полагают, что внехромосомные гены рибосомной РНК в виде автономной кольцевой ДНК могут быть промежуточной формой при амплификации генов рРНК дрожжей. Такая внехромосомная форма генов рРНК выявлена также у целого ряда других низших эукариот.

Обнаружение внехромосомных плазмид (2μ и 3μ) и подробное исследование их структурно-функциональной организации дало мощный толчок работам по созданию молекулярных векторов и использованию *S. cerevisiae* для клонирования генов. Данная эукариотическая система предоставляет экспериментаторам принципиально новые возможности по сравнению с бактериальными клетками.

12.3. ПЛАЗМИДНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ

Генно-инженерные манипуляции на *S. cerevisiae* стали реальны лишь после того, как экспериментально была доказана возможность генетической трансформации дрожжевых клеток. Клеточная стенка дрожжей препятствует проникновению экзогенной ДНК в клетку. Поэтому была разработана процедура получения протопластов клеток *S. cerevisiae*. Она состоит в том, что дрожжевые клетки инкубируют в осмотически стабилизирующем растворе, содержащем ферменты, которые разрушают клеточную стенку. Дрожжелитической активностью обладают ферментные препараты, выделенные из самых разных источников. К таким препаратам, например, относятся экстракт пищеварительного сока виноградной улитки и фермент глюкуронидаза из желчи животных.

Поскольку дрожжевые протопласты не способны к регенерации клеточной стенки в жидкой среде, их смешивают с расплавленной ага-

ризованной средой и выливают на чашку Петри. Клетки, погруженные в агар, восстанавливают клеточную стенку и формируют в его толще колонии.

Попытки трансформировать протопласты мутантных штаммов *S. cerevisiae* препаратами суммарной ДНК из дрожжей дикого типа долгое время не давали положительных результатов. Преодолеть данное затруднение удалось лишь в 1978 г., когда А. Хиннен с соавторами для трансформации протопластов использовали препараты гибридных плазмид *E. coli*, несущих индивидуальные фрагменты хромосомной ДНК *S. cerevisiae* с определенными генами (см. 12.4.1). Успех был достигнут благодаря тому, что в препарате трансформирующей плазмидной ДНК относительное содержание индивидуального гена дрожжей было многократно выше, чем в тотальной ДНК клетки.

Для адсорбции экзогенной ДНК на поверхности протопластов необходимы катионы кальция, а проникновение молекул ДНК внутрь протопластов происходит во время слияния протопластов, индуцированного полиэтиленгликолем (ПЭГ-4000). Недостатком данной процедуры является то, что в результате трансформации гаплоидного штамма могут образоваться как диплоидные, так и полиплоидные протопласты (а затем и клоны клеток). Используя специальные приемы, слияние более чем двух протопластов можно свести к минимуму. Другой недостаток метода состоит в том, что колонии трансформантов располагаются в толще агара, что усложняет дальнейшие манипуляции с ними.

До 1983 г. все генно-инженерные эксперименты проводились на протопластах *S. cerevisiae*. Однако Х. Ито с соавторами обнаружили, что плазмидную трансформацию клеток дрожжей можно осуществить и без удаления клеточной стенки. Для этого клетки обрабатывают полиэтиленгликолем в присутствии катионов щелочных металлов (Li^+, Cs^+, Rb^+, K^+, Na^+). Особенно хорошие результаты дает использование солей лития. Интересно отметить, что компетентность клеток дрожжей индуцирует в основном ПЭГ, а перечисленные катионы лишь повышают эффективность плазмидной трансформации.

Я. Иимура с соавторами в том же году показали, что клетки *S. cerevisiae*, обработанные охлажденным $CaCl_2$ и затем быстро перенесенные на 37 °C, могут достаточно эффективно поглощать плазмидную ДНК. При этом обработка клеток полиэтиленгликолем не требуется, что указывает на разный механизм влияния катионов Ca^{2+} и Li^+ на процесс проникновения чужеродной ДНК в клетки дрожжей.

Многочисленные эксперименты показали, что в зависимости от штамма *S. cerevisiae* и типа векторной плазмиды оптимальные условия трансформации как протопластов, так и обработанных солевыми растворами клеток могут существенно различаться. В целом следует отметить, что наивысшего уровня плазмидной трансформации удается достичь в системе протопластов дрожжей. Поэтому в тех случаях, когда необходимо получить представительную клонотеку гибридных плазмид и выявить в ней редко встречающиеся последовательности, предпочитают использовать протопласты. Эффективность плазмидной трансформации с помощью «солевых» методов на 1–2 порядка ниже, зато эти методы гораздо проще и дают высоковоспроизводимые результаты. Колонии трансформантов образуются на поверхности агаризованной среды, что позволяет осуществлять их перепечатку и т. п. Поэтому, когда не требуется максимальный уровень трансформации (например, при введении индивидуальной плазмиды, когда достаточно выделить несколько клонов), предпочитают проводить обработку клеток дрожжей растворами полиэтиленгликоля и солей лития.

С «солевой» методикой конкурирует метод электропорации клеток дрожжей. Эта процедура чрезвычайно проста и при правильном подборе условий обеспечивает примерно такой же уровень плазмидной трансформации, как и обработка клеток солями лития. Процедура электропорации выполняется в течение 10 мин, в то время как «солевой» метод занимает 2 ч, а метод протопластов — 3 ч.

Д. Армалео с соавторами в 1990 г. показали, что плазмиды можно вводить в нативные клетки дрожжей при бомбардировке последних разогнанными до большой скорости (около 500 м/с) вольфрамовыми микрочастицами (диаметр 0,5–0,65 мкм), на которых адсорбированы молекулы плазмидной ДНК (так называемая генная пушка). Если адсорбировать на микрочастицах молекулы двух разных плазмид, данным методом удается осуществлять трансформацию дрожжей обеими плазмидами одновременно (котрансформацию) с частотой, близкой к 100 %.

Таким образом, методология введения чужеродной ДНК в клетки дрожжей *S. cerevisiae* разработана достаточно хорошо, что позволяет успешно проводить эксперименты по клонированию и экспрессии генов в клетках данного низшего эукариотического организма.

12.4. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЕКТОРЫ *S. CEREVISIAE*

12.4.1. Векторы интеграции

В 1977 г. Б. Рацкин и Дж. Карбон клонировали в плазмиде ColE1 коннекторным методом фрагменты хромосомной ДНК дрожжей *S. cerevisiae*. Гибридные плазмиды вводили в клетки *E. coli*, имеющие определенные мутации, и отбирали бактериальные клоны, в которых эти мутации комплементировались. Так были выделены плазмиды pYe*his*1, pYe*his*2 и pYe*his*3 (комплементировали делеционную мутацию в гене *his*B *E. coli*, кодирующем имидазолглицеролфосфатдегидрогеназу), а также плазмиды pYe*leu*10, pYe*leu*11, pYe*leu*12 и pYe*leu*17 (комплементировали мутацию *E. coli leu*B6, повреждающую фермент β-изопропилмалатдегидрогеназу).

А. Хиннен с сотрудниками в 1978 г. показали, что после введения плазмиды pYe*leu*10 в протопласты *S. cerevisiae leu*2 удается выявить клоны трансформантов дрожжей с фенотипом *Leu*$^+$. Аналогичные результаты были получены при трансформации плазмидой pYe*his*1 штамма *S. cerevisiae his*3. Оказалось, что изученные плазмиды трансформируют дрожжи за счет рекомбинационной встройки гибридной ДНК в соответствующую хромосому по области гомологии. Так, плазмида pYe*his*1 интегрировалась исключительно по области *his*3 дрожжевой хромосомы XV. При этом примерно в 10 % случаев интеграция происходила по механизму замещения *his*3 сегментом *HIS*3 из состава плазмиды (рис. 12.8), а в подавляющем большинстве случаев в результате одиночного кроссинговера встраивалась вся плазмида, что приводило к дупликации в хромосоме клонированной дрожжевой последовательности. Образующиеся тандемные дупликации нестабильны и приводят к внутримолекулярной рекомбинации и постепенному выщеплению избыточной последовательности с частотой 0,1–1 % на клеточное деление. В результате формируются субклоны, часть из которых уже стабильно сохраняет фенотип *His*$^+$.

Эффективность интеграционной трансформации *S. cerevisiae* зависит от размера фрагмента, гомологичного локусу хромосомной ДНК. Чем выше гомология гибридной ДНК с определенным районом хромосомной ДНК дрожжей, тем выше уровень генетической трансформации клеток, но выше и частота выщепления трансформированного признака в нестабильных клонах.

Плазмиды рассмотренного типа предложено называть интегративными векторами и обозначать YIp (от англ. yeast integrating plasmid). Уровень трансформации протопластов дрожжей такими плазмидами низок: от 0,1 до нескольких десятков колоний трансформантов на 1 мкг ДНК плазмиды. Однако обнаружено, что если в *S. cerevisiae* вводить плазмиды, содержащие двухцепочечный разрыв внутри последовательности, гомологичной дрожжевой хромосомной ДНК, то трансформация происходит с гораздо большей эффективностью. Плазмида при этом интегрируется в гомологичный локус генома, и более половины трансформантов со-

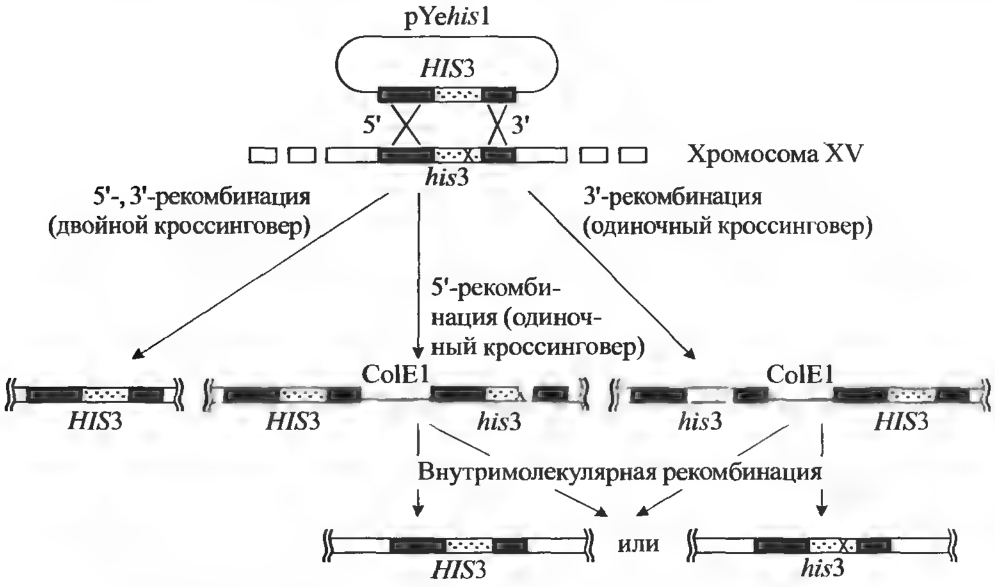


Рис. 12.8. Схема интеграции плазмиды pYe*his*1 в хромосому *S. cerevisiae* за счет рекомбинации по областям гомологии

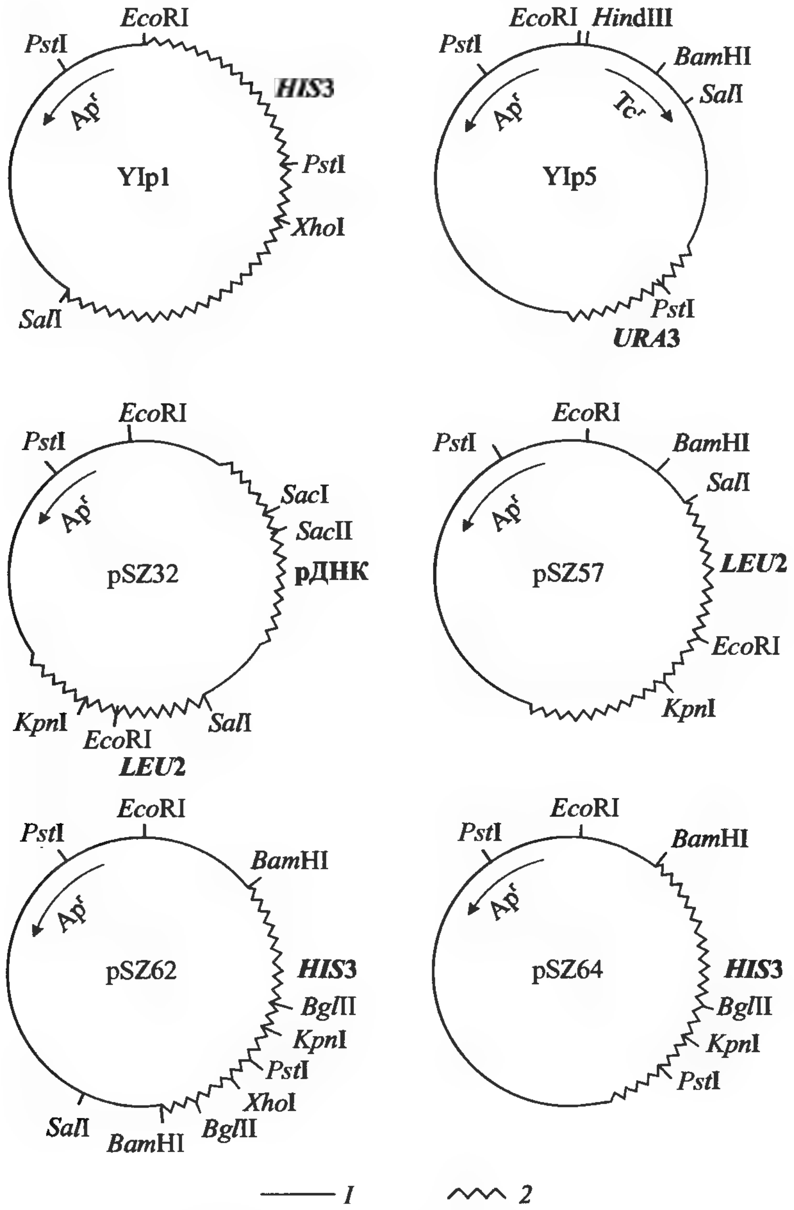


Рис. 12.9. Интегративные векторные плазмиды *S. cerevisiae*:
1 — плазмида *E. coli*; *2* — хромосомная ДНК *S. cerevisiae*

держат множественные копии интегрированной плазмиды, расположенные тандемно. Наблюдается большая гетерогенность индивидуальных клонов трансформантов по числу копий встроившихся плазмид.

Т. Орр-Вевер с сотрудниками (1981–1983 гг.) исследовали данное явление, использовав плазмиды pSZ32, pSZ57, pSZ62 и pSZ64 (рис. 12.9). Кольцевую форму плазмид переводили в линейную гидролизом определенными рестриктазами. Полученными препаратами плазмидных ДНК трансформировали протопласты *S. cerevisiae*. Результаты этих экспериментов показали, что трансформация стимулируется не только единичными разрывами плазмид, но и выщеплением рестриктазами внутреннего участка клонированного фрагмента дрожжевой ДНК, как, например, в pSZ32 (табл. 12.1).

Трансформация дрожжей линейной формой плазмиды pSZ62, в которой рестриктазой *Bgl*II из *HIS*3-фрагмента выщеплен сегмент величиной 800 пн, доказала, что такая делеция стимулирует интеграцию гибридной ДНК и, более того, в процессе встройки восстанавливается структура делетированного участка.

Полученные результаты позволили авторам предложить модели интеграции кольцевой и линейной форм гибридных плазмид в геном клеток *S. cerevisiae* (рис. 12.10). По мнению авторов, возникающие в процессе встройки в геном дрожжей множественные тандемные повторы гибридных плазмид — результат после-

Таблица 12.1. **Эффективность трансформации клеток *S. cerevisiae* плазмидными ДНК, содержащими двухцепочечный разрыв**

Рестриктаза	Место гидролиза плазмиды	Число трансформантов на 1 мкг плазмидной ДНК
	pSZ64	
—	—	0,2
*Eco*RI	pBR322	3–18
*Bam*HI	Край вставки	9–33
*Kpn*I	*HIS*3	510–750
*Bgl*II	*HIS*3	5–450
	pSZ57	
—	—	0,1–0,2
*Bam*HI	pBR322	1,4–1,7
*Sal*I	Край вставки	0,9–2,9
*Kpn*I	*LEU*2	12–17
	pSZ32	
—	—	50–90
*Sac*I	рДНК	1100–3300
*Sac*I/*Sac*II	рДНК	1400–4800

довательной интеграции плазмид в одно и то же место. В дальнейшем при делении клеток трансформантов число тандемных повторов постепенно уменьшается, достигая определенного стабильного уровня.

Доказана возможность совместного введения (контрансформации) разных плазмид в одну и ту же клетку *S. cerevisiae* с последующей интеграцией обеих плазмид в геном клетки. Причем область гомологии с хромосомной ДНК клетки-реципиента может иметь лишь одна из этих плазмид. Второй плазмиде достаточно содержать район, гомологичный любой последовательности первой плазмиды. А. Замир с соавторами (1981 г.) использовали данный подход для введения в геном *S. cerevisiae nif*-оперона из *Klebsiella pneumoniae*. Одна из вводимых плазмид — pYe*his*4 — имела область гомологии с хромосомной ДНК дрожжей и интегрировалась за счет этого в геном клетки. Вторая плазмида, несущая *nif*-оперон (pWK220), имела гомологию с pYe*his*4 по последовательности гена *tet*. Именно по этому району pWK220 интегрировалась в геном дрожжей, содержащий pYe*his*4. При этом наблюдали тандемную интеграцию копий *nif*-плазмиды в реципиентную хромосому. В общем виде схема такой интеграционной котрансформации представлена на рис. 12.11. Следует отметить, что при ограниченной гомологии двух плазмид между собой повторно будет встраиваться в геном клетки преимущественно плазмида интеграции, а не котрансформируемая плазмида.

Рассмотренный подход позволяет интегрировать в геном дрожжей любой чужеродный ген или кластер генов и изучать их функционирование в ядре клетки. Перспективен в этом плане амплифицируемый локус дрожжей *CUP*1, детерминирующий устойчивость клеток к солям меди. Этот ген клонирован, и с его помощью можно осуществлять коинтеграцию чужеродных генов в геном дрожжей. В процессе культивирования полученных трансформантов на средах с последовательно повышающимися концентрациями ионов меди происходит коамплификация встроенных генов. Такой подход к созданию суперпродуцентов чужеродных белков с успехом используется на системе культивируемых клеток животных.

Другой метод амплификации чужеродных генов в клетках дрожжей предложили Дж. Боек с соавторами (1988 г.). Геном *S. cerevisiae* содержит от 30 до 40 копий транспозона *Ty*. Данный транспозон имеет размер 5,3 тпн, содержит две протяженные открытые рамки трансляции и ограничен с обеих сторон прямыми повторами длиной 335 пн (δ-участки). Транспозиция *Ty* происходит в результате транскрипции всей последовательности с промотора δ-участка и перевода транскрипта затем в молекулу двухцепочечной ДНК обратной транскриптазой, кодируемой *Ty*. Транспозон *Ty* клонировали в составе плазмиды YEp-типа (см. 12.4.2) и δ-промотор в транспозоне заместили индуцируемым (регулируемым) промотором гена *GAL*1. При добавлении в среду галактозы транскрипция с данного промотора многократно увеличивается. После введения гибридной плазмиды pGTyH3 (рис. 12.12) в клетки *S. cerevisiae* и индукции транскрипции с p_{GAL1} были обнаружены вирусоподобные частицы и обратная транскриптаза. Тем самым доказано, что ретровирусы и *Ty* имеют общее происхождение. Также оказалось, что индукция транскрипции приводит и к индукции транспозиции *Ty* в разные участки хромосом *S. cerevisiae*.

Затем на примере бактериального гена *neo* и дрожжевого *TRP*1, встроенных в 3′-концевую область транспозона (см. рис. 12.12), удалось показать, что с помощью *Ty* можно переносить в различные участки генома клеток-хозяев множественные копии чужеродных генов (до 10). Важной особенностью создаваемых конструкций является то, что во встраиваемом фрагмен-

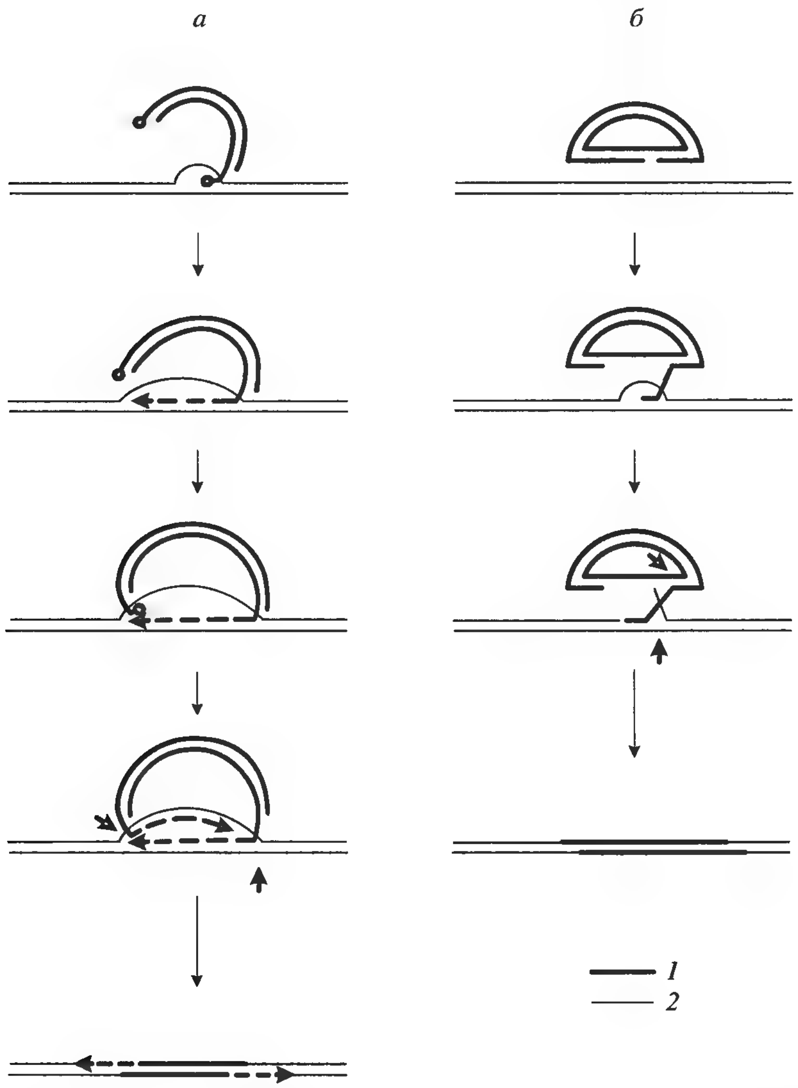


Рис. 12.10. Модель интеграции линейной (*а*) и кольцевой (*б*) форм плазмиды (*1*) в хромосомную ДНК *S. cerevisiae* (*2*).

Короткими стрелками обозначены места разрыва цепей ДНК

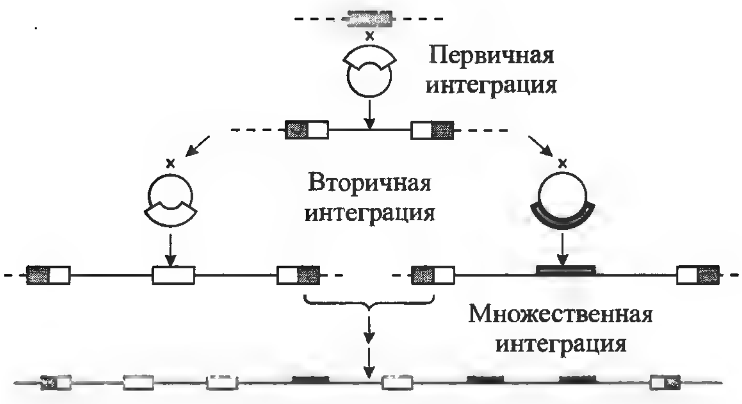


Рис. 12.11. Схема коинтеграции плазмид в геном дрожжей-сахаромицетов

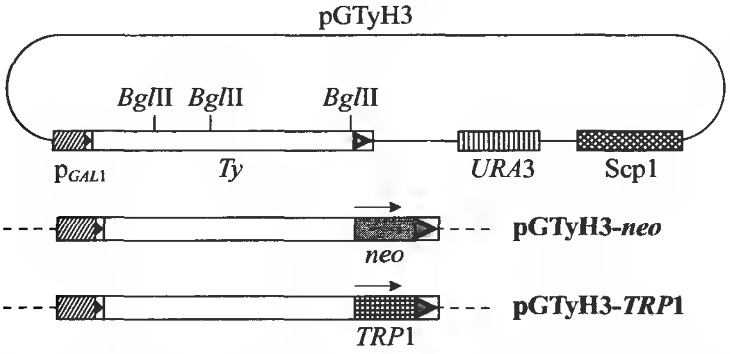


Рис. 12.12. Структура гибридных плазмид, содержащих дрожжевой транспозон *Ty*

те должны быть удалены терминаторы транскрипции, т. е. транспозон должен транскрибироваться полностью. Показано, что в составе *Ty* может быть успешно перенесен фрагмент ДНК размером до 2,7 тпн.

Таким образом, описанный подход позволяет распределить копии чужеродных генов по разным участкам дрожжевого генома. Он может оказаться перспективным при создании промышленных штаммов дрожжей, экспрессирующих чужеродные гены. Такие штаммы должны более стабильно сохранять свойства суперпродукции чужеродного белка (за счет дозы гена), чем штаммы, несущие многокопийные внехромосомные плазмиды. Последние, как правило, с относительно высокой частотой утрачиваются клетками, особенно при отсутствии селективного давления по маркерам плазмид.

12.4.2. Клонирующие векторы

Для решения ряда задач молекулярной биологии, особенно прикладного характера, предпочитают клонировать гены в многокопийных автономных векторных ДНК. В связи с этим при разработке генно-инженерной системы *S. cerevisiae* большое внимание уделялось созданию многокопийных векторных плазмид. Лучше всего для этого подходит плазмида Scp1 (см. 12.2.1). Однако отсутствие селективных признаков, детерминируемых данной плазмидой, делало невозможным использовать ее напрямую в качестве молекулярного вектора. Поэтому начиная с 1978 г. в ряде лабораторий сконструированы различные гибридные плазмиды, содержащие репликоны дрожжевой плазмиды Scp1 и бактериальной плазмиды, а также последовательности ДНК, определяющие селективные признаки плазмиды в клетках *S. cerevisiae* и *E. coli* (рис. 12.13). Частота трансформации протопластов дрожжей плазмидами данного типа составляет (5–20) · 10^3 трансформантов на 1 мкг плазмидной ДНК, т. е. значительно выше, чем для плазмид YIp-типа. Определено, что трансформированные клетки дрожжей содержат до 40 копий плазмид на клетку. Гибридные ДНК во всех проанализированных клонах при этом выявлялись во внехромосомном состоянии, и, кроме того, трансформирующая ДНК могла интегрироваться в хромосому рекомбинацией по гомологичным участкам. Таким образом, эти молекулы являются эписомами дрожжей, поэтому их предложено называть эписомными векторами — YEp (от англ. yeast episomal plasmid). Мультикопийная внехромосомная природа таких гибридных плазмид в клетке была определена не только биохимически, но и генетически. Когда трансформированные гаплоидные штаммы скрещивали с бесплазмидными мутантными гаплоидами и образующиеся диплоиды затем спорулировали, в подавляющем большинстве случаев расщепление трансформантов по фенотипу составляло 4 : 0, что характерно только для генов, наследуемых внехромосомно.

Векторы YEp-типа являются челночными плазмидами, способными реплицироваться как в клетках бактерии *E. coli*, так и в дрожжах. Такой вариант векторов удобен в первую очередь тем, что наработку гибридных ДНК и ряд других манипуляций обычно легче осуществлять в бактериальных клетках.

Сначала в качестве селективных маркеров плазмид для дрожжевой системы использовали хромосомные гены *S. cerevisiae*, обеспечивающие комплементацию ауксотрофных мутаций. Это вынуждало работать с узким кругом хорошо охарактеризованных мутантных штаммов дрожжей. Гораздо проще и многостороннее подход, при котором создают плазмиды, детерминирующие устойчивость к антибиотикам, аналогам метаболитов, токсическим соединениям (табл. 12.2). Такие маркеры доминантны и обеспечивают селекцию трансформантов независимо от генотипа клетки-хозяина.

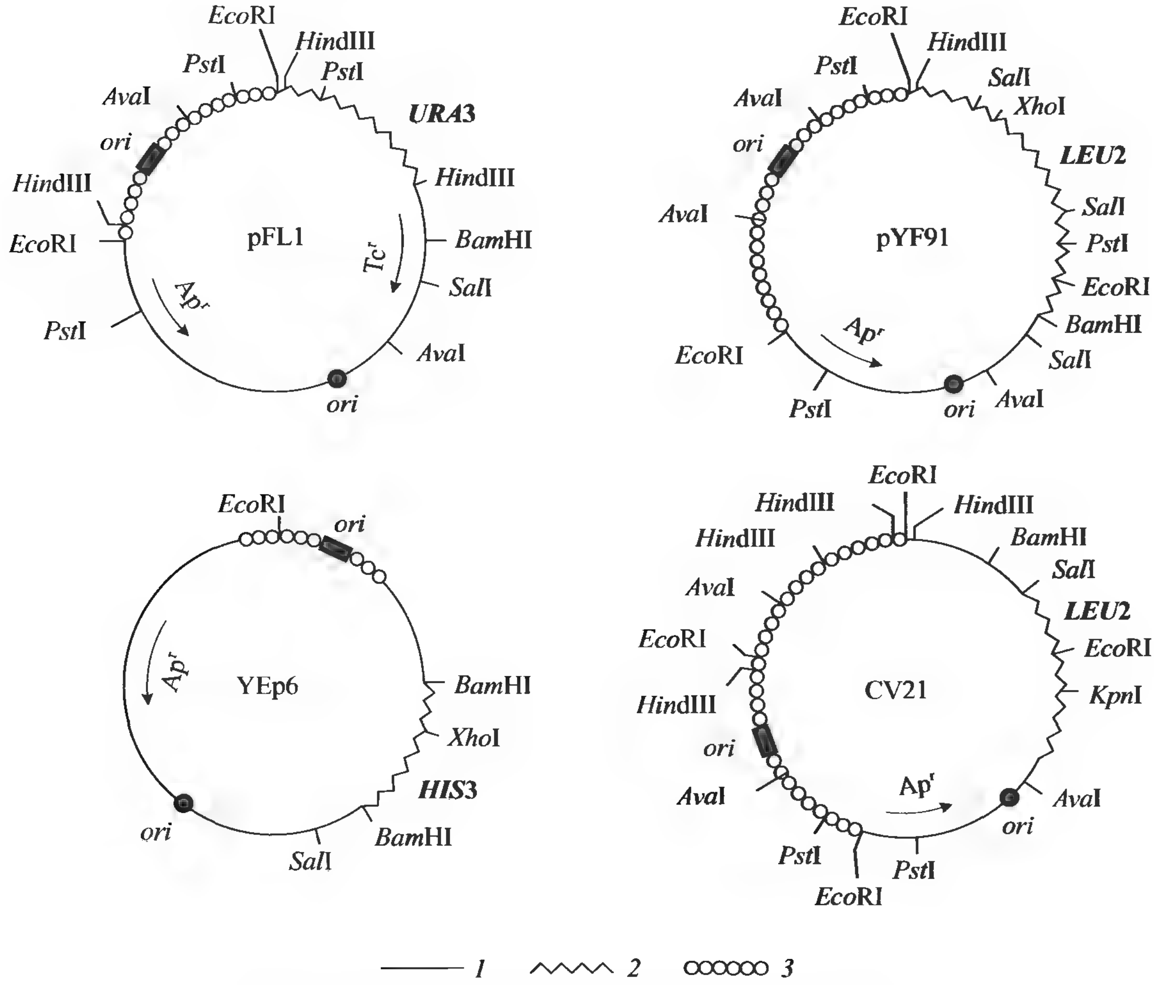


Рис. 12.13. Эписомные векторные плазмиды *S. cerevisiae*:

1 — плазмида *E. coli*; *2* — хромосомная ДНК *S. cerevisiae*; 3 — последовательность Scp1

Сконструировать другой тип автономных многокопийных векторных плазмид для клеток дрожжей удалось в 1979 г. при работе с гибридными плазмидами *E. coli* pBR322 или pBR313, содержащими *Eco*RI-фрагмент ДНК *S. cerevisiae* и комплементирующими мутацию *E. coli trp*C1117. Ген *trp*C *E. coli*, кодирующий фосфорибозилантранилатизомеразу, соответствует локусу дрожжей *TRP*1. Гибридные плазмиды, содержащие область *TRP*1, использовали для трансформации протопластов *S. cerevisiae*. При этом уровень трансформации составил 10^3–10^4 клонов с фенотипом *Trp*$^+$ на 1 мкг ДНК плазмиды, что на 3 4 порядка выше, чем для плазмид YIp-типа, к которому данные плазмиды первоначально были отнесены. Как выяснилось, высокий уровень трансформации обусловлен тем, что клонированный фрагмент ДНК наряду с селектируемым дрожжевым геном содержит область начала репликации дрожжевой хромосомы, что обеспечивает возможность автономной репликации гибридной плазмиды. Плазмида с аналогичными свойствами была случайно получена и при клонировании района *ARG*4. Доказано, что гибридные плазмиды, содержащие дрожжевой репликатор, находятся в ядре клеток *S. cerevisiae* исключительно во внехромосомном состоянии. По-видимому, функционирующий *ori* репликации предотвращает возможную рекомбинацию гибридной плазмиды с областью гомологии на хромосоме дрожжей. Плазмиды этого типа предложено называть репликаторными векторами — YRp (от англ. yeast replicating plasmid).

В лаборатории Дэвиса в 1980 г. удалось разработать метод клонирования и простого отбора последовательностей, обеспечивающих автономную репликацию плазмидных ДНК в клетках дрожжей. Эти последовательности были обозначены *ARS* (от англ. autonomously replicating sequence). Обнаружено, что интегративная векторная плазмида YIp5 (см. рис. 12.9) не способна трансформировать к прототрофности штамм *S. cerevisiae ura*3-52. Мутация

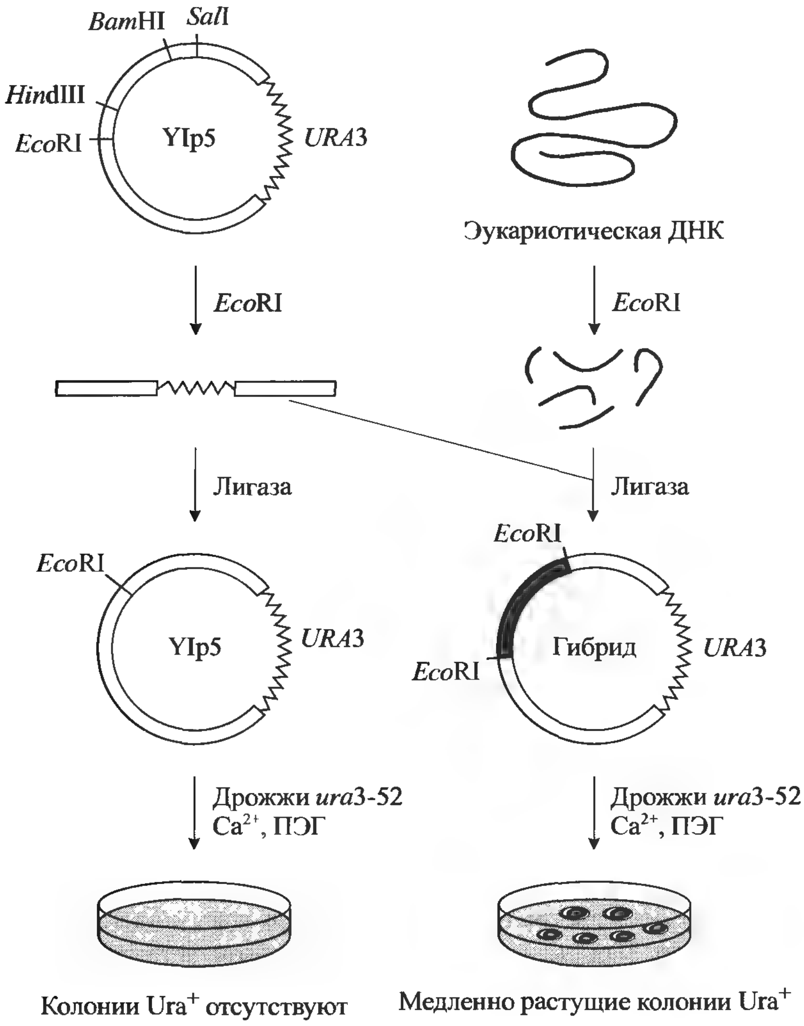


Рис. 12.14. Схема отбора *ARS*-последовательностей

Таблица 12.2. **Примеры генов устойчивости к химическим соединениям, используемых в качестве доминантных селективных маркеров при молекулярном клонировании в клетках *S. cerevisiae***

Маркерный ген, продукт гена	Природный источник	Соединение
Хлорамфениколацетилтрансфераза	*Escherichia coli*	Хлорамфеникол
Дигидрофолатредуктаза		Метотрексат
Аминогликозид-фосфотрансфераза		G-418
Гигромицин-фосфотрансфераза		Гигромицин
5-Енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтетаза		Глифосфат
Ген устойчивости к флеомицину		Флеомицин
Металлотионеин	*Saccharomyces cerevisiae*	Ионы меди
*tcm*1		Триходермин
*cyh*2		Циклогексимид
Тимидинкиназа	Вирус простого герпеса	Сульфаниламид Аминоптерин
RIM-C	*Candida maltosa*	Циклогексимид

*ura*3-52 представляет собой делецию в гене *URA*3, которая, по-видимому, затрудняет рекомбинацию гена *URA*3 (оротидин-5'-фосфатдекарбоксилаза), находящегося в плазмиде YIp5, с этим мутантным хромосомным локусом. Трансформация мутанта *S. cerevisiae ura*3-52 плазмидой YIp5 возможна лишь в том случае, если плазмида получит способность реплицироваться в клетке. Это позволило предложить схему клонирования и отбора *ARS*-последовательностей (рис. 12.14).

По данной схеме клонированы многочисленные *ARS*-последовательности из самых разных эукариотических организмов. Интересно отметить, что в ДНК *E. coli ARS*-последовательности выявить не удалось. В то же время они обнаружены в стафилококковых плазмидах pC194 и pE194. Очевидно, далеко не все клонированные в дрожжах *ARS*-последовательности из гетерологичных организмов являются реальными репликаторами в своих клетках. Они могут случайно оказаться репликатороподобными для *S. cerevisiae*. Секвенирование различных клонированных *ARS*-последовательностей позволило проанализировать их структуру. Выяснено, что дрожжевые репликаторы имеют короткую консервативную последовательность:

$$5' \left(\begin{matrix}A\\T\end{matrix}\right) N \left(\begin{matrix}A\\T\end{matrix}\right)\left(\begin{matrix}A\\T\end{matrix}\right) \mathrm{AAAPyATAAA} \left(\begin{matrix}A\\T\end{matrix}\right) 3'$$

$$3' \left(\begin{matrix}A\\T\end{matrix}\right) N \left(\begin{matrix}A\\T\end{matrix}\right)\left(\begin{matrix}A\\T\end{matrix}\right) \mathrm{TTTPuTATTT} \left(\begin{matrix}A\\T\end{matrix}\right) 5'$$

Наличие данного участка (А-домена) является обязательным, но не достаточным условием проявления активности *ARS*. Значительное влияние на эффективность функционирования репликатора дрожжей оказывает В-домен, прилегающий слева к А-домену. В-домен имеет размер 50–100 пн и характеризуется высоким содержанием АТ-пар. Его делеция приводит к ослаблению или полной инактивации функции *ARS*. Для эффективного функционирования репликатора имеет значение также последовательность справа от А-домена — С-домен, но ее роль пока менее изучена.

Репликация хромосом у эукариот инициируется одновременно в нескольких участках. Расстояние, разделяющее два соседних участка на хромосоме, в которых происходит инициация репликации, определяется как длина хромосомного репликона. Средняя длина хромосомных репликонов у млекопитающих оценивается в 45–90 тпн. Такого же порядка длина хромосомного репликона у дрожжей (36 тпн). В гаплоидном геноме *S. cerevisiae* должно быть примерно 400 *ARS*-последовательностей. Некоторые из выделенных *ARS* являются уникальными последовательностями, т. е. встречаются в геноме дрожжей только один раз. К ним, в частности, относятся *ARS*1 и *ARS*13, прилегающие соответственно к гену *TRP*1 и центромерному локусу хромосомы III. Репликаторы другого типа повторены в геноме от 3 до 15 раз. Одна из выделенных *ARS*-последовательностей относится к многократно повторяющимся. Она обнаружена в составе кластера генов рРНК (см. рис. 12.2) и имеет 100–140 копий на хромосоме XII.

Накопление результатов структурно-функционального анализа многочисленных *ARS*-последовательностей дрожжей позволит более точно установить механизмы регулирования репликации хромосом данного низшего эукариотического организма и глубже понять процесс репликации эукариотических хромосом в целом.

12.4.3. Стабильные молекулярные векторы

Многочисленные эксперименты показали, что плазмиды YRp- и YEp-типа при росте клеток дрожжей в отсутствие селективного давления по маркерам плазмид теряются с высокой частотой.

Плазмиды YEp-типа относительно стабильны в штаммах cir$^+$. В штаммах cir^0 стабильно поддерживаются лишь гибридные ДНК, содержащие полную копию плазмиды Scp1 с неповрежденными генетическими детерминантами *REP*1, *REP*2 и *STB*.

М. Добсон с соавторами (1980 г.) обнаружили, что плазмида YEp-типа в клетках cir$^+$ *S. cerevisiae* способна рекомбинировать с эндогенной плазмидой Scp1. В результате после длительного культивирования в селективных условиях можно выявить клоны дрожжевых клеток, содержащих плазмиду Scp1 с геном, по которому ведется селекция и который первоначально находился в гибридной челночной плазмиде. При этом последовательности бактериальной плазмиды в сформировавшейся *in vivo* гибридной Scp1 отсутствуют. Такая плазмида поддерживается в клетках дрожжей уже относительно стабильно (после 500 циклов деления в неселективных условиях гибридная Scp1 сохранялась в 68 % клеток).

Хотя гибридные плазмиды YEp-типа являются высококопийными, на стабильность их поддержания в клетках дрожжей прежде всего влияет не копийность, а способность правильно распределяться между клетками при делении

почкованием, т. е. наличие неповрежденных детерминант Scp1, ответственных за эти функции.

Для изученных плазмид YRp-типа установлена очень высокая частота сегрегации при митотическом делении клеток дрожжей. Так, 95–99 % клеток *S. cerevisiae* после 10 генераций в неселективных по маркеру плазмиды условиях теряют YRp7, содержащие *ARS*1, целиком. Даже в условиях селективного давления по маркеру *Trp*$^+$ после 14 генераций 60–90 % клеток утрачивают плазмиду. Аналогично ведут себя плазмиды серии pYe*arg*4, несущие *ARS*2.

Гибридные плазмиды, содержащие *ARS*-область повторяющейся единицы генов рРНК дрожжей, обнаруживают исключительно высокую митотическую нестабильность в реципиентных штаммах *S. cerevisiae*. Частота потери клетками таких плазмид почти на порядок выше частоты сегрегации плазмид с *ARS*1 или *ARS*2. Это связано, очевидно, с относительно низким числом копий данных плазмид в трансформированной клетке.

Как видим, у плазмид YRp-типа из-за отсутствия в их структуре генетических элементов, необходимых для равномерного распределения между клетками при делении, главным фактором, влияющим на стабильность наследования, является копийность. Однако даже высококопийные варианты плазмид YRp-типа утрачиваются клетками дрожжей с большой частотой.

Для того чтобы добиться равномерного распределения плазмидных ДНК при делении клеток дрожжей, была предпринята работа по клонированию центромерных областей хромосом *S. cerevisiae*. Большое значение сыграла прекрасная изученность генетической организации дрожжей-сахаромицетов. Например, было известно, что ген *CDC*10 расположен в непосредственной близости к центромере. Л. Кларк и Дж. Карбон (1980 г.) встроили в плазмиду pLC544, несущую *ARS*1 и ген *TRP*1, фрагмент хромосомы III, содержащий ген *CDC*10 и прилегающую к нему центромерную область хромосомы. Плазмида была обозначена pYe(*CDC*10)1, а клонированная центромерная область — *CEN*3. Оказалось, что данная плазмида митотически и мейотически высокостабильна. Так, после 20–30 генераций в неселективных условиях 97 % клеток по-прежнему содержали pYe(*CDC*10)1. Исходная плазмида pLC544 в тех же условиях практически полностью терялась. В процессе мейоза плазмидный маркер *CDC*10 расщеплялся как 2 : 2. При этом доказано, что pYe(*CDC*10)1 не интегрировалась в геном *S. cerevisiae*.

На основе клонированного элемента *CEN*3 были также сконструированы плазмиды, несущие *ARS*2. Копийность плазмид, содержащих *CEN*3 и *ARS*1 или *ARS*2, составила в среднем одну молекулу на гаплоидный геном. Тем не менее они стабильно поддерживались в клетках при митотическом и мейотическом делениях. По всем признакам плазмиды, имеющие в своем составе *CEN*3 и какой-либо *ARS*, ведут себя как кольцевые мини-хромосомы. Генетические данные показывают, что они не спариваются ни с одной из нормальных хромосом дрожжей, в процессе мейоза строго расходятся к противоположным полюсам, что указывает на спаривание их друг с другом.

Митотическая стабилизация плазмид, индуцируемая центромерной ДНК, позволила разработать в лаборатории Дж. Карбона (1981 г.) метод прямой селекции фрагментов ДНК, содержащих такие области. Плазмида YRp7 при росте дрожжей в неселективных условиях примерно через 20 генераций полностью элиминируется из популяции клеток, в то время как эта же плазмида, содержащая *CEN*3, сохраняется в таких условиях по крайней мере в 90 % клеток. На этом основан метод клонирования и отбора центромерных районов: ДНК, гидролизованную определенной рестриктазой, статистически встраивают в YRp7; после трансформации дрожжевых клеток отбирают клоны, содержащие гибридные плазмиды, и последовательно пассируют их перепечаткой на агаризованной полной среде (неселективные условия). При этом нестабильные плазмиды постепенно элиминируются, а остаются только стабильные варианты гибридных плазмид, которые должны содержать центромерные области. После высева пассированных таким образом клонов на селективную по маркеру плазмиды среду вырастут лишь клоны, несущие стабильные плазмиды.

Для проверки предложенного подхода из статистической библиотеки генов *S. cerevisiae*, полученной на основе векторной плазмиды YRp7 при клонировании в клетках *E. coli*, были взяты 500 независимых гибридных ДНК. После трансформации дрожжей отобрали клоны, содержащие гибридные плазмиды, и пассировали их в неселективных условиях. После 5 пассажей было выделено 24 стабильных *Trp*$^+$-клона, несущих автономную плазмиду. Выявленные гибридные плазмиды, содержащие вставки хромосомной ДНК *S. cerevisiae*, сегрегировали при мейозе как мини-хромосомы (2 : 2). Проверка на стабильность при размножении в неселек-

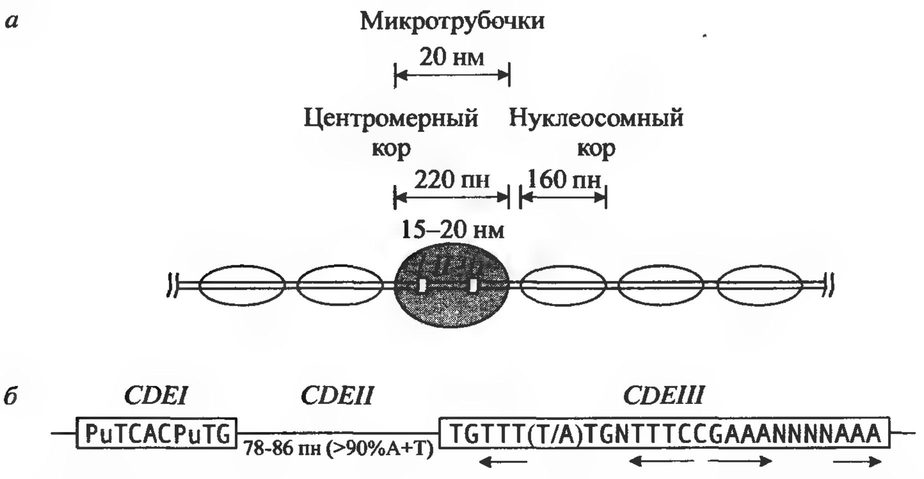


Рис. 12.15. Структура хроматина в области центромеры (*а*) и обобщенная последовательность центромерной ДНК хромосом *S. cerevisiae* (*б*).

I, *II*, *III* соответствуют *CDEI*, *CDEII*, *CDEIII*.
Стрелками под последовательностью *CDEIII* отмечены районы зеркальной симметрии

тивных условиях показала, что после 20 генераций плазмиды сохранялись в 85–100 % клеток.

Плазмиды, содержащие центромерные области, предложено называть векторами YCp-типа (от англ. yeast centromere containing plasmid). Главным преимуществом этих векторов является их высокая митотическая и мейотическая стабильность. К недостаткам следует отнести низкую копийность в клетке и соответственно низкую дозу клонированного гена.

Разработанный метод клонирования и отбора центромерных участков хромосом в клетках дрожжей позволил впервые изолировать центромеры эукариотических хромосом и изучить их структурную организацию.

Центромера — участок хромосомы, обеспечивающий правильное расхождение хромосом в митозе и мейозе в результате взаимодействия с элементами аппарата веретена клетки. Используя описанный выше метод, удалось клонировать в составе плазмид центромеры всех 16 хромосом *S. cerevisiae*. Для этих фрагментов определена последовательность нуклеотидов. Хотя каждая центромера представлена уникальной последовательностью ДНК, в их структуре имеются общие элементы, определяющие взаимодействие центромер с микротрубочками аппарата веретена. Центромеры (рис. 12.15) имеют два консервативных элемента *CDEI* и *CDEIII* (от англ. centromere DNA element), разделенных АТ-богатой областью *CDEII*, не имеющей статистически значимой гомологии в разных центромерах. Показано, что минимальная длина последовательности полностью функциональной центромеры составляет 130–150 пн. При этом центромера не упаковывается в нуклеосомы, как остальная хромосомная ДНК, а связывается по крайней мере с пятью белками, которые образуют кор, соответствующий кинетохору — месту прикрепления нитей веретена (см. рис. 12.15). Тубулины, из которых состоят микротрубочки, непосредственно с ДНК не взаимодействуют, и их присоединение к центромере происходит за счет взаимодействия с центромерными белками, находящимися в комплексе с ДНК.

Для изучения влияния структуры центромер на их функционирование были проведены многочисленные эксперименты по мутагенезу клонированных центромерных участков. Оказалось, что нарушение структуры любого из трех *CDE* приводит к снижению митотической и мейотической стабильности гибридных плазмид. Наиболее выраженный отрицательный эффект наблюдается при изменении последовательности нуклеотидов в центре частичной симметрии элемента *CDEIII* (см. рис. 12.15).

Центромерная ДНК не транскрибируется. Включение в плазмиду в непосредственной близости от центромеры промотора p_{GAL1}, направленного в сторону этой центромеры, приводит при индукции галактозой к транскрипции с этого промотора и подавлению активности центромеры. Это влечет за собой дестабилизацию наследования плазмиды.

Избыточное содержание в клетке клонированных центромер приводит к токсическому эффекту. Так, в клетках дрожжей за счет введения разных плазмид, имеющих независимые селективные маркеры, удалось повысить копийность *CEN3* до 13. В результате культуры содержали большое число погибших клеток и плаз-

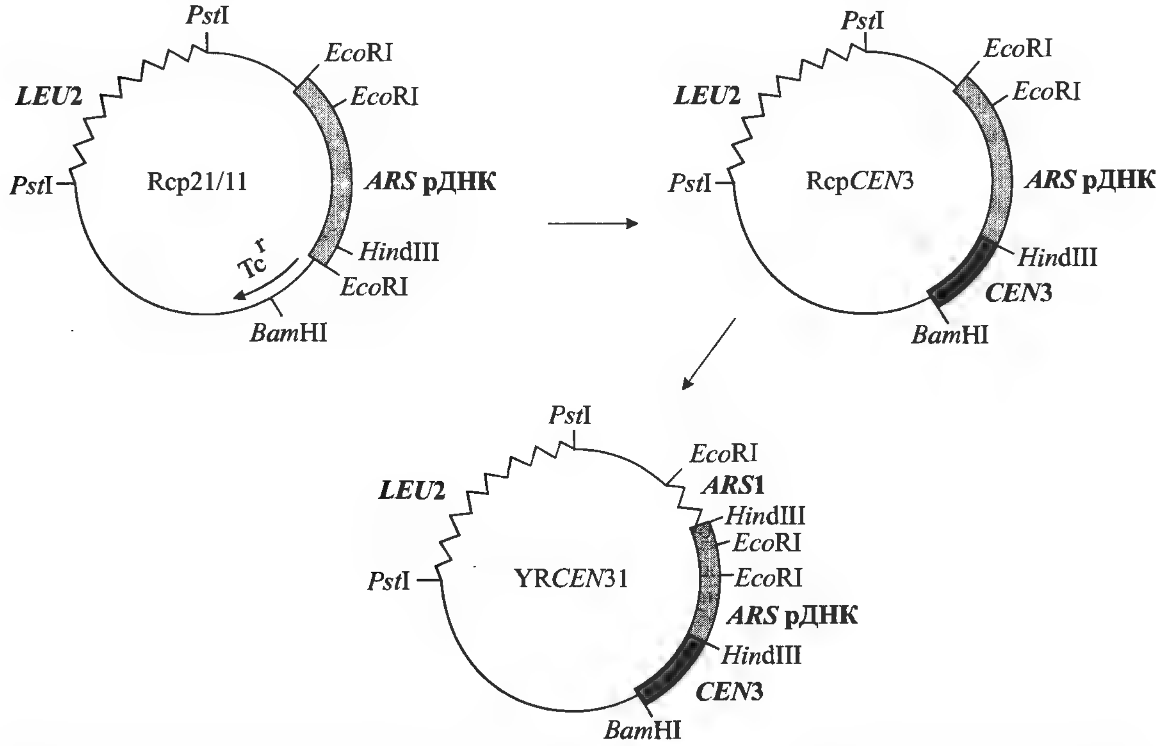


Рис. 12.16. Создание плазмид, способных к автономной репликации и стабильному поддержанию в клетках *S. cerevisiae*

миды были митотически нестабильны, но имели необычно высокую копийность. По-видимому, это обусловлено конкуренцией центромер за какой-либо фактор, присутствующий в клетке в ограниченном количестве, например микротрубочки, центромерасвязывающие белки и др.

Изучение функции центромер в составе гибридных плазмид имеет определенные ограничения. Оно не позволяет выявить тонкие дефекты функций центромер, поскольку такие плазмиды гораздо менее стабильны в митозе по сравнению с природными хромосомами. Поэтому важен подход, основанный на введении в состав хромосом измененных центромерных участков, инактивации природной центромеры или замены ее на другую. Инактивации центромерного локуса в составе хромосомы можно добиться встройкой в этот локус интегративного вектора, несущего нефункциональный гомологичный центромерный локус. Хромосома с инактивированной центромерой становится крайне нестабильной. Стабилизировать такую хромосому можно, введя в ее состав через другой интегративный вектор новую центромеру. Центромера при этом может быть включена не в центромерный локус хромосомы, а в другой участок. Более того, интегрируемая центромера может быть гетерологичной, т. е. от другой хромосомы. Последнее, в частности, указывает на то, что центромеры не являются хромосомоспецифичными (т. е. они взаимозаменяемы).

Таким образом, используя методы генетической инженерии, впервые удалось выделить центромеры эукариотических хромосом и начать их подробное структурно-функциональное исследование.

В отличие от *S. cerevisiae* о молекулярной структуре центромер других организмов известно мало. Так, делящиеся дрожжи *Schizosaccharomyces pombe*, которые имеют всего 3 хромосомы, обладают более сложной структурой центромерных областей хромосом. Протяженность центромер у них превышает 50 тпн. Возможно, усложнение структуры центромеры связано с большими размерами хромосом у *S. pombe*, что приводит к созданию более мощного кинетохора. Это, в частности, объясняет тот факт, что попытки клонировать в системе *S. cerevisiae* центромерные участки хромосом других эукариот не увенчались успехом.

Проводимые исследования позволят установить общие закономерности и индивидуальные различия в организации и функционировании центромер эукариотических хромосом разных организмов. При этом основополагающие результаты будут получены на простой системе дрожжей-сахаромицетов.

Как уже указывалось, плазмиды, несущие *ARS*-последовательности рДНК *S. cerevisiae*,

очень нестабильны в клетках дрожжей. Поэтому представляло интерес изучить, как введение центромерных участков будет влиять на поддержание в клетках таких плазмид. В. Л. Ларионов с соавторами (1982 г.) ввели локус *CEN*3 в плазмиду Rcp21/11 (рис. 12.16), содержащую *ARS*-область рДНК. Сконструированная плазмида Rcp*CEN*3 после 20 генераций в неселективных условиях сохранялась лишь в 20 % клеток. Дополнительная встройка последовательности *ARS*1 значительно повысила стабильность полученной плазмиды YR*CEN*31. На основании этих результатов авторы сделали вывод о том, что нестабильность поддержания плазмид Rcp21/11 и Rcp*CEN*3 в клетках дрожжей обусловлена низкой эффективностью функционирования репликатора (*ARS* рДНК). Таким образом, для стабильного поддержания плазмид YCp-типа в клетках *S. cerevisiae* необходимо наряду с центромерной областью иметь в составе этих плазмид эффективно функционирующие репликаторы.

12.4.4. Линейные молекулярные векторы

Искусственные дрожжевые хромосомы. Хромосомы *S. cerevisiae* дуплицируются и разделяются с высокой точностью. В процессе митоза хромосома дрожжей может теряться с частотой 10^{-4}–10^{-5} на одно деление. При мейозе утрата какой-либо хромосомы происходит в среднем с частотой $2 \cdot 10^{-4}$ на жизнеспособную спору.

Для эффективного сохранения и наследования дрожжевых линейных хромосом необходимы по крайней мере три элемента: репликатор, центромера и теломера. Теломерами называют концевые элементы линейных хромосом, обеспечивающие их структурную целостность, стабильность и полную репликацию.

Для начальных исследований теломер удобным объектом оказались инфузории. В их вегетативном ядре (макронуклеусе) хромосомы фрагментированы. Более того, линейные мини-хромосомы, кодирующие гены рибосомных РНК, можно выделить в препаративных количествах. Впервые структуру концов рДНК *Tetrahymena thermophila* изучили Е. Блэкборн и Дж. Голл (1978 г.). Они показали, что ДНК на конце хромосомы формирует шпильку благодаря ковалентно замкнутым концам двухцепочечной ДНК (рис. 12.17). Более того, концевой участок рДНК гетерогенен по длине, так как индивидуальные молекулы имеют вариации по числу повторов (от 20 до 70) последовательности 5′ CCCCAA 3′. На цепи $(C_4A_2)_n$ двухцепочечной ДНК имеется несколько разрывов после второго А в гексамере C_4A_2. На цепи $(G_4T_2)_n$ также имеется разрыв.

В дальнейшем подобные исследования были проведены с хромосомами низших эукариот других видов, и во всех случаях в теломерной области обнаружены аналогичные тандемно повторяющиеся блоки:

Равноресничные инфузории (тетрахимена, глаукома, парамеция)	$(C_4A_2)_n$
Брюхоресничные инфузории (стилонихия, окситриха)	$(C_4A_4)_n$
Жгутиконосцы (трипаносома, лептомонас, лейшмания, критидия)	$(C_3T_1A_2)_n$
Слизевики:	
физарум	$(C_3T_1A)_n$
диктиостелиум	$(C_{1-8}T)_n$

Исходя из схожести организации теломер Дж. Шостак и Е. Блэкборн предположили, что они могут выполнять свои функции в гетерологичном организме. В 1982 г. данные авторы опубликовали результаты экспериментов по клонированию теломер тетрахимены в клетках *S. cerevisiae* в составе линейных плазмид. В качестве основы для создания плазмиды использовали вектор YRp-типа pSZ213, содержащий *ARS*1 и маркерные гены *LEU*2 и *HIS*3 *S. cerevisiae* (рис. 12.18). Его переводили в линейную форму гидролизом рестриктазой *Bgl*II (расщепление происходило по последовательности гена *HIS*3). К полученной линейной форме (8,7 тпн) добавляли концевой *Bam*HI-фрагмент рДНК *Tetrahymena thermophila* (1,5 тпн), отделенный от других фрагментов этой мини-хромосомы электрофорезом и выделенный из геля агарозы. Поскольку образованные *Bam*HI и *Bgl*II липкие концы идентичны (см. табл. 1.2), они могут быть соединены в ковалентную двухцепочечную структуру с помощью ДНК-лигазы. Однако продукт такой реакции уже не будет гидролизоваться ни *Bam*HI, ни *Bgl*II. Учитывая это, лигирование фрагментов проводили в присутствии рестриктаз *Bam*HI и *Bgl*II. Это предотвращало образование кольцевых и димерных (мультимерных) форм плазмидной ДНК, а так-

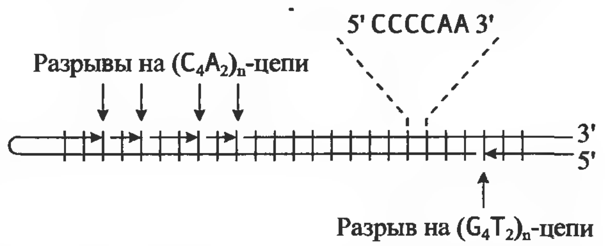


Рис. 12.17. Структура концевых участков рДНК *Tetrahymena*

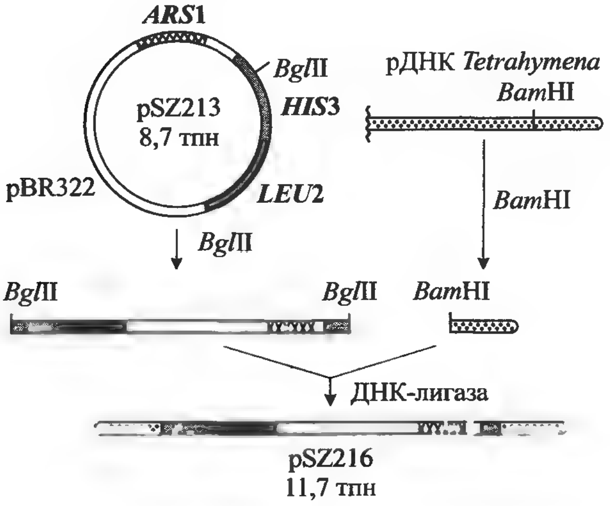


Рис. 12.18. Конструирование *in vitro* линейной плазмиды pSZ216

же димеризацию концевых фрагментов рДНК. Продукты такой нетрадиционной лигазной реакции разделяли электрофорезом в геле агарозы. Наблюдали 4 полосы молекул ДНК, две из которых соответствовали по размеру исходным субстратам лигазной реакции, а две другие — плазмиде pSZ213, сшитой с одним или двумя концевыми фрагментами рДНК тетрахимены. Более крупные молекулы ДНК (11,7 тпн) выделяли из геля и этим препаратом трансформировали протопласты *S. cerevisiae*. Трансформанты отбирали по фенотипу *Leu*$^+$. Из 15 проанализированных трансформантов 14 были нестабильны по признаку *Leu*$^+$, что косвенно свидетельствует о внехромосомном наследовании этого маркера. После выделения дрожжевой ДНК и анализа ее электрофорезом были выявлены линейные молекулы размером примерно 12 тпн. Копийность этих молекул составила около 20 на клетку. Однако учитывая, что даже в селективных условиях культивирования полученных клонов данную линейную плазмиду содержали менее половины клеток, копийность оценили величиной 40–60.

Анализ поддерживаемых в клетках *S. cerevisiae* линейных плазмид показал, что *in vivo* в сконструированную плазмиду включаются многократно повторяющиеся тандемные последовательности $(C_{1-3}A)_n$, которые удлиняют концевые районы примерно на 200 пн. Как в дальнейшем выяснилось, такая последовательность характерна для теломер дрожжевых хромосом.

Успешное создание гибридной линейной плазмиды, несущей на концах теломеры рДНК тетрахимены, позволило в дальнейшем клонировать теломерные последовательности из хромосом дрожжей. С этой целью Дж. Шостак и Е. Блэкборн с помощью рестриктазы *Pvu*I удалили из созданной линейной плазмиды pSZ216 одну из теломерных последовательностей тетрахимены и вместо нее статистически присоединили *Pvu*I-фрагмент суммарной хромосомной ДНК *S. cerevisiae*. Лигазной смесью трансформировали клетки дрожжей и отбирали колонии *Leu*$^+$. Из 60 проанализированных клонов 56 были митотически нестабильны по фенотипу *Leu*$^+$, они содержали линейные плазмиды. Детальный анализ клонированных таким образом теломерных участков *S. cerevisiae* показал, что на их конце многократно повторена последовательность $C_{1-3}A$. Кроме того, к концевому повтору прилегают Y-последовательность, представляющая собой тандемно повторенную 3–4 раза последовательность ДНК длиной 6,7 тпн, и X-последовательность, варьирующая по длине от 0,3 до 3,7 тпн. Последовательности Y и X имеют в своем составе *ARS*-элементы (рис. 12.19). Эти субтеломерные последовательности дрожжевых хромосом подвергаются значительным перестройкам, их число варьирует от хромосомы к хромосоме и от штамма к штамму. Высокий полиморфизм объясняется процессами рекомбинации и генной конверсии, эффективно протекающими между концевыми повторами.

После того как были выявлены особенности структурной организации теломер, встал вопрос о том, как происходит их репликация. Первым этапом репликации теломеры, по-видимому, является формирование ковалентно зашитых цепей ДНК, необходимых для продвижения репликационной вилки к концу молекулы (рис. 12.20). По завершении репликации этого участка шпилечная структура теломеры превращается в центр протяженного инвертированного повтора. Были предложены модели процесса «разрешения» теломер в области такого инвертированного повтора (рис. 12.21).

Модель репликации и «разрешения» теломер была подвергнута экспериментальной проверке Дж. Шостаком (1983 г.) в опытах на клетках *S. cerevisiae*. Шпильки на концах мини-хромосомы рДНК тетрахимены гидролизовали нуклеазой S1 и пришили к ним синтетические линкеры, содержащие сайт рестриктазы *Bam*HI. Затем рДНК расщепляли рестриктазой *Xho*I

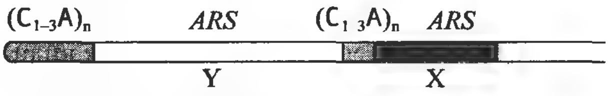


Рис. 12.19. Организация теломеры хромосом дрожжей *S. cerevisiae*

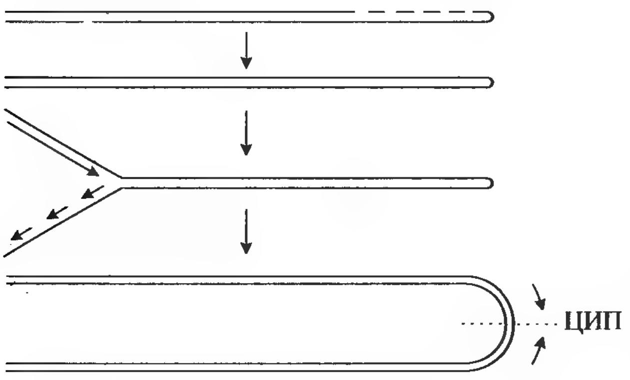


Рис. 12.20. Модель репликации теломеры.

ЦИП — центр инвертированного повтора, образовавшегося в результате репликации

и полученные концевые *Bam*HI–*Xho*I-фрагменты встраивали в сайт *Sal*I челночной плазмиды (*Xho*I и *Sal*I генерируют одинаковые липкие концы, но не являются изошизомерами). При этом могла произойти только встройка дуплекса концевых фрагментов *TEL* рДНК, соединенных «голова к голове» (искусственный инвертированный повтор теломеры). Сконструированную кольцевую плазмиду вводили в клетки дрожжей, где происходило «разрешение» инвертированного повтора и плазмида переходила в линейную форму с теломерными шпильками на концах. Дж. Шостак предположил, что синтез теломерных концевых последовательностей осуществляется нематрично с помощью ферментов типа трансфераз и корректируется экзонуклеазами и полимеразами.

В той же лаборатории в 1986 г. показано, что если между инвертированными повторами *TEL* в кольцевой плазмиде встроить фрагмент экзогенной ДНК, то в клетках дрожжей плазмида будет оставаться кольцевой.

Важно отметить, что линейная плазмида pSZ216 имела бóльшую копийность и была митотически более стабильна, чем исходная кольцевая плазмида pSZ213 (см. рис. 12.18), хотя частота утраты ее клетками *S. cerevisiae* оставалась высокой. Поэтому было решено полностью воссоздать молекулу ДНК, состоящую из всех основных элементов дрожжевой хромосомы: репликатора, теломер и центромеры. Сконструированная стандартными методами генетической инженерии кольцевая плазмида на основе pBR322 содержала ген *LEU2*, центромеру *CEN3*, репликатор *ARS1* и инвертированный повтор *TEL* рДНК тетрахимены. В трансформантах *S. cerevisiae*, отобранных по фенотипу *Leu*$^+$, данная плазмида находилась в линейной форме, т. е. представляла собой искусственную дрожжевую хромосому. Оказалось, что такие искусственные линейные хромосомы, имеющие небольшой размер (от 7 до 15 тпн), митотически гораздо менее стабильны по сравнению с плазмидами YCp-типа. При встройке в такую мини-хромосому ДНК гибридного фага λ ее размер увеличился до 50 тпн и стабильность наследования существенно возросла. Показано также, что в составе искусственной дрожжевой хромосомы можно клонировать 2–3 тандемные копии ДНК фага λ.

Учитывая полученные в лаборатории Шостака результаты, Д. Бюрк с соавторами в 1987 г. предложили метод клонирования больших фрагментов ДНК в составе искусственных дрожжевых хромосом. Была сконструирована векторная плазмида pYAC4 (от англ. yeast artificial chromosome), теломеры которой разделены фрагментом дрожжевой ДНК. Клонирование в этом векторе возможно либо по *Eco*RI-, либо по *Sma*I-сайту (рис. 12.22). Схема клонирования чужеродных фрагментов ДНК в YAC-системе включает вырезание *Bam*HI-фрагмента и расщепление линейной формы по участку *Sma*I (или *Eco*RI) с последующей встройкой экзогенной ДНК. После лигазной реакции смесь фрагментов ДНК вводят в протопласты *S. cerevisiae* и отбирают трансформант с фенотипом *Ura*$^+$*Trp*$^+$. Если в качестве хозяина используют штамм *S. cerevisiae*, имеющий дополнительно

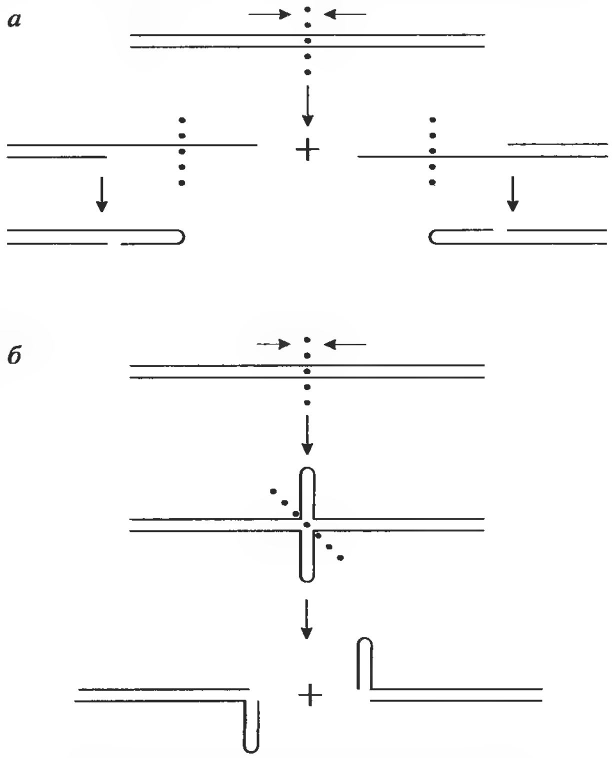


Рис. 12.21. Модели «разрешения» теломеры:

а — модель Бэтмена; *б* — модель Шостака

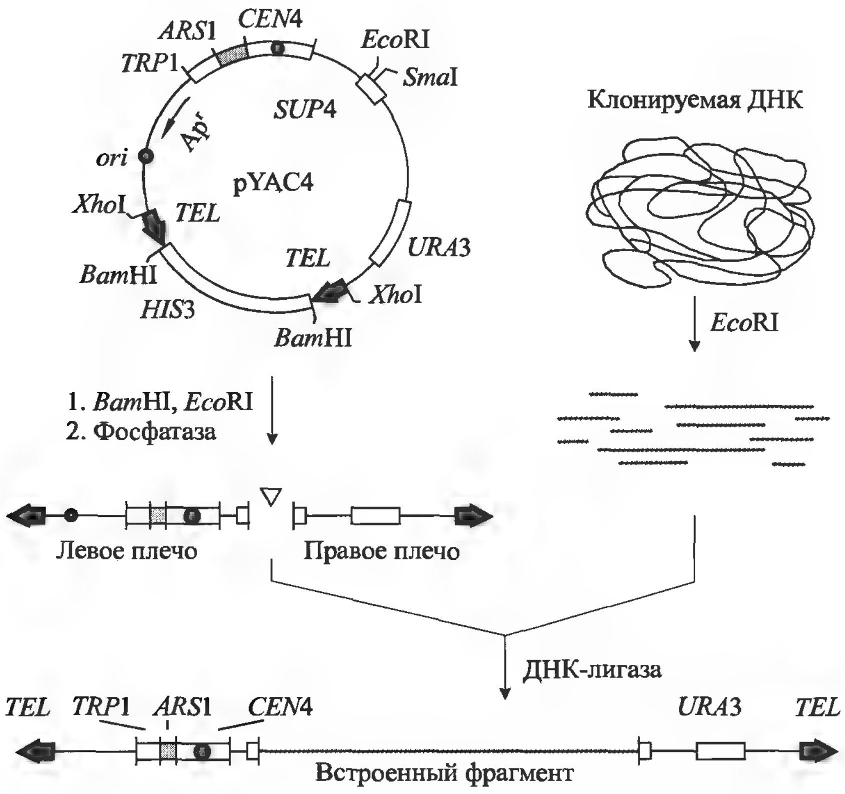


Рис. 12.22. Система клонирования гигантских фрагментов ДНК в составе искусственных линейных хромосом дрожжей-сахаромицетов

ochre-мутацию (см. 6.4) гена *ade*2 (образует колонии красного цвета), то при введении в него в составе плазмиды нативного гена *SUP*4 происходит супрессия мутации *ade*2 и формируются колонии белого цвета. При встройке экзогенной ДНК в pYAC4 ген *SUP*4 повреждается. Поэтому по окраске колоний можно легко отличить трансформанты, содержащие гибридные варианты pYAC4, от несущих исходный вектор.

Клонирование в YAC-системе оказалось очень перспективным для создания библиотек генов высших эукариот. Используя данный подход, можно получать клонотеки гибридных искусственных хромосом дрожжей, несущих фрагменты чужеродной ДНК размером до 400 тпн и более. Отделение гибридных искусственных хромосом от остального генома осуществляется с помощью пульс-электрофореза.

Встройка и амплификация таких крупных фрагментов позволяет клонировать весь геном изучаемого организма в виде относительно небольшого числа гибридных мини-хромосом. Так, Р. Энанд с соавторами (1990 г.) показали, что при среднем размере встройки 350 тпн число клонов гибридных YAC, содержащих трехкратный эквивалент всего генома изучаемой линии клеток человека, составляет 35 тыс. Таким образом, данный подход чрезвычайно перспективен при изучении структурно-функциональной организации сложно устроенного и огромного генома высших эукариот, и в частности человека.

Х. Кук и С. Кросс (1988 г.) в векторную плазмиду pYAC4 дополнительно ввели ген *neo* из состава pSV2-*neo*. На основе полученного вектора pYAC4-*Neo* можно создавать гибридные искусственные хромосомы дрожжей, содержащие ДНК клеток млекопитающих, а затем индивидуальными гигантскими молекулами трансформировать соответствующие клетки млекопитающих, отбирать на среде с антибиотиком G-418 клоны трансформантов и проводить в них функциональный анализ введенных сегментов генома.

Цитоплазматические линейные киллерные плазмиды. В 1981 г. Н. Гунге описал линейные двухцепочечные ДНК — плазмиды pGKL1 и pGKL2, находящиеся в цитоплазме клеток дрожжей *Kluyveromyces lactis* и определяющие киллерный фенотип. При этом оказалось, что собственно киллерный фенотип детерминирует меньшая плазмида pGKL1 (8,9 тпн), а бóльшая pGKL2 (13,4 тпн) обеспечивает репликацию обеих плазмид. Данные линейные двухцепочечные молекулы ДНК имеют на концах инвертированные повторы длиной около 200 пн, и с их 5′-концами ковалентно связаны

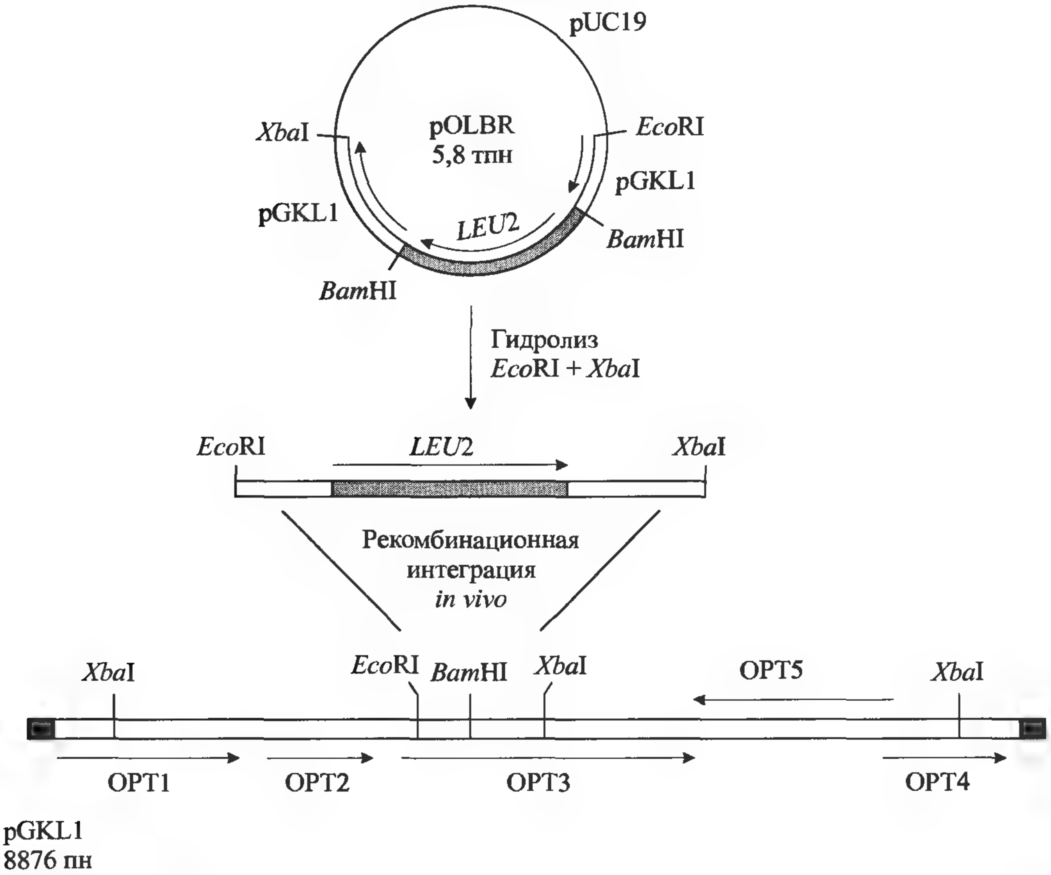


Рис. 12.23. Схема интеграции гена *LEU2 S. cerevisiae* в линейную плазмиду pGKL1. Темные блоки на концах pGKL1 — инвертированные повторы

специфичные белки. Расшифровка последовательности нуклеотидов и дальнейший анализ позволили выявить 5 открытых рамок трансляции у pGKL1 и 10 OPT у pGKL2. OPT3 и OPT4 плазмиды pGKL1 (рис. 12.23) кодируют субъединицы киллерного токсина, а продукт OPT5 является белком иммунности. OPT1 кодирует ДНК-полимеразу. Для pGKL2 известно, что она кодирует ДНК-полимеразу, РНК-полимеразу и ряд других белков.

Следует отметить, что эти плазмиды — не уникальный случай организации внехромосомных самореплицирующихся молекул ДНК. Линейные плазмиды описаны также для многих видов фитопатогенных грибов, бактерий *Borrelia burgdorferi*, *Streptomyces rochei* и высшего эукариота *Zea mays* (кукурузы).

Оказалось, что плазмиды pGKL1 и pGKL2 можно переносить в клетки других дрожжей, включая *S. cerevisiae*, и экспрессировать в них. Более того, эти плазмиды в новых хозяевах поддерживаются очень стабильно без какого-либо селективного давления. (Особенностью дрожжей-сахаромицетов является то, что плазмиды pGKL нестабильны в них в присутствии митохондрий, но могут стабильно поддерживаться в дефектных по дыханию *rho*^{0} штаммах.) Это позволило рассматривать pGKL1 и pGKL2 в качестве кандидатов для разработки на их основе векторной системы с широким кругом хозяев среди различных видов дрожжей.

Для создания такой векторной системы предприняты попытки ввести селективный маркер *LEU2* в состав pGKL1. Встройка *in vitro* гена *LEU2 S. cerevisiae* в плазмиду pGKL1, введение гибридной молекулы в дрожжи-сахаромицеты и последующий отбор трансформантов *Leu*$^+$ приводили к формированию *in vivo* кольцевой двухцепочечной молекулы, локализованной в ядре клетки, а не в цитоплазме, как pGKL. Опыты по рекомбинационной интеграции гена *LEU2* в pGKL1 *in vivo* (см. рис. 12.23) позволили выявить в трансформантах *Leu*$^+$ линейные формы гибридной pGKL1. Но при этом такая линейная плазмида находилась в ядре, не имела на концах ковалентно связанных белков, а содержала дрожжевые теломеры, гетерогенные по длине (несколько сотен пар нуклеотидов).

Авторы предположили, что такие необычные формы гибридной pGKL1 появляются потому, что ген *LEU2* не способен экспрессироваться в цитоплазме клеток дрожжей. Встроив коди-

рующую последовательность гена *LEU2* между промотором и терминатором транскрипции ОРТ3 плазмиды pGKL1, после рекомбинационной интеграции *in vivo* получили трансформанты *Leu*$^+$, в цитоплазме которых обнаруживались линейные гибридные плазмиды. С концами этих молекул ДНК были ковалентно связаны специфичные для данных плазмид белки.

Таким образом, создана векторная система на основе линейных цитоплазматических плазмид *Kluyveromyces lactis*. Для экспрессии экзогенных кодирующих последовательностей, даже генов дрожжей-реципиентов гибридной плазмиды, необходимо встраивать их под промоторы, специфичные для этой цитоплазматической системы. С аналогичной ситуацией мы встретимся при рассмотрении генно-инженерной системы поксвирусов, которые являются цитоплазматическими вирусами (см. 14.5).

12.5. КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ *S. CEREVISIAE*

12.5.1. Экспрессирующие векторные системы *S. cerevisiae*

Клонирование и секвенирование большого числа генов *S. cerevisiae* позволило установить основные закономерности их структурной организации. Промоторы дрожжей имеют как схожие черты с промоторами высших эукариот, так и отличия от них. Они содержат характерный для эукариотических промоторов ТАТА-бокс (блок Хогнесса, см. 4.1.), однако в отличие от высших эукариот у дрожжей расстояние между ТАТА-элементом и участком инициации транскрипции составляет не 25–30 пн, а 60–100 пн. Кроме того, ТАТА-боксу обычно предшествует сайт активации (upstream activation site, UAS), расположенный на расстоянии 100 и более пар нуклеотидов. Интересно, что для инициации транскрипции некоторых генов дрожжей не требуется ТАТА-элемент, но при этом необходим сайт активации. Функция UAS состоит в том, что с ними связываются специфичные белки клетки, которые взаимодействуют в свою очередь с факторами, активирующими инициацию транскрипции.

Функция UAS не зависит от его ориентации относительно участка инициации транскрипции. В то же время ТАТА-бокс (последовательность ТАТАА) является однонаправленным элементом промотора и ориентирует движение транскрипционного комплекса лишь в одну сторону (противоположная ориентация ТТТАТА нефункциональна). Между тем у *S. cerevisiae* довольно часто встречаются конститутивно транскрибируемые гены, расположенные «голова к голове». Оказалось, что такие пары разнонаправленных генов имеют поли(dA·dT)-гомополимерные участки, которые могут функционировать в клетках дрожжей как двунаправленные промоторные элементы. Как видим, промоторы дрожжевых генов разнообразны по структуре, обычно имеют относительно большую протяженность, и их функционирование, вероятно, существенно зависит от «укладки» ДНК *in vivo*, в результате которой элементы промотора сближаются на требуемое расстояние.

Для того чтобы выявить закономерности структурно-функциональной организации промоторов *S. cerevisiae*, в ряде лабораторий были созданы молекулярные векторы, предназначенные для статистического отбора промоторсодержащих фрагментов ДНК в клетках дрожжей. В каждом случае плазмида содержит селективный ген, лишенный собственного промотора, перед которым находится уникальный рестрикционный сайт (рис. 12.24). После встройки в правильной ориентации промоторсодержащего фрагмента наблюдается экспрессия соответствующего гена, позволяющая легко выявить искомые гибридные клоны.

В плазмиде pAYE6 для отбора промоторов используется ген *tk* тимидинкиназы вируса простого герпеса HSV-1. В дрожжах *S. cerevisiae* ген *tk* отсутствует, и эндогенная продукция нуклеотида TMP из dUMP происходит при участии фермента тимидилатсинтетазы (см. рис. 13.3). Блокирование биосинтеза TMP легко осуществляется введением в питательную среду антагонистов фолиевой кислоты типа аминоптерина, тем самым предотвращается репликация ДНК дрожжей. На такой селективной среде будут расти только клоны трансформантов, несущих pAYE6 со встроенными промоторсодержащими фрагментами.

В pVC701 для отбора промоторов используют структурный ген кислой фосфатазы *PHO5* *S. cerevisiae*. На среде с α-нафтилфосфатом колонии дрожжей в зависимости от продукции фосфатазы окрашиваются в белый (нет активности), розовый (слабая активность) или темно-красный (сильная активность) цвет.

Плазмида pPCO обеспечивает селекцию как однонаправленных, так и двунаправленных про-

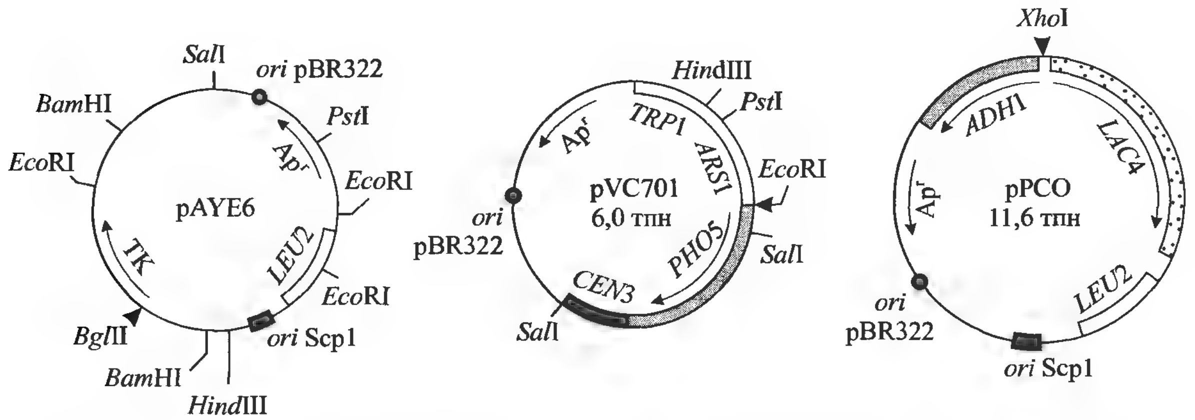


Рис. 12.24. Векторные плазмиды для отбора промоторных фрагментов в клетках *S. cerevisiae.*

Треугольником отмечены сайты рестрикции, по которым происходит встройка и селекция промоторсодержащих фрагментов ДНК

моторов. В данной плазмиде фрагменты ДНК встраиваются между беспромоторными кодирующими последовательностями генов *ADH*1 алкогольдегидрогеназы *S. cerevisiae* и *LAC*4 β-галактозидазы дрожжей *Kluyveromyces lactis*.

Статистическое клонирование многочисленных промоторов дрожжей и подробная их характеризация со временем позволят более точно определить связь структуры и эффективности функционирования промоторов данного организма. В ходе этих исследований будут также выделены высокоэффективные промоторы, которые можно будет использовать для конструирования экспрессирующих векторов.

В настоящее время при создании экспрессирующих векторов идут несколько иным путем — используя промоторы хорошо охарактеризованных генов *S. cerevisiae*. Как правило, первоначально клонируют целевой ген, изучают его экспрессию в клетках дрожжей и расшифровывают нуклеотидную последовательность. Затем по выбранной стратегии выщепляют промотор и вводят в определенную векторную плазмиду.

Дрожжевые гены наиболее просто клонировать и отбирать по функциональной комплементации мутантных клеток. Причем при внедрении клонируемых генов в многокопийные векторные плазмиды за счет повышенной дозы гена обычно наблюдается суперпродукция соответствующего дрожжевого белка (такой белок гораздо проще выделить в чистом виде и изучить его свойства).

Показательной в данном плане является работа Р. Диксона, выполненная в 1980 г. Ген *LAC*4 дрожжей *Kluyveromyces lactis*, кодирующий β-галактозидазу, встроили в три разные векторные плазмиды *S. cerevisiae*: YIp5, YRp7 и YEp6. Соотношение уровней продукции β-галактозидазы в трансформантах *S. cerevisiae*, несущих разные гибридные плазмиды, составляло 1 : 13 : 25 соответственно, что, по-видимому, определялось дозой гена в клетках трансформантов.

В ряде лабораторий при клонировании чужеродных генов в *S. cerevisiae* установлено, что для создания эффективных штаммов-продуцентов необходимо встраивать ген-эквивалент в многокопийную плазмиду под контроль сильного дрожжевого промотора. При этом уровень продукции целевого белка может существенно зависеть от структуры создаваемого гибридного гена. Первая элегантная работа, подтверждающая данное заключение, была выполнена Р. Хитземаном с соавторами в 1981 г. Авторы объединили в плазмиде YRp-типа ген-эквивалент лейкоцитарного интерферона человека с различными по размеру фрагментами, содержащими промотор активно функционирующего гена *ADH*1 алкогольдегидрогеназы *S. cerevisiae*. На первом этапе был получен набор промоторсодержащих фрагментов (рис. 12.25, 12.26), которые вводили в векторную плазмиду pFRL4 (рис. 12.27). После этого в гибридные плазмиды серии pFRP встраивали по *Eco*RI-месту синтезированный через кДНК ген-эквивалент зрелой формы (без сигнального пептида) лейкоцитарного интерферона $\alpha 1$. В результате были сконструированы плазмиды серии pFRSn, в которых структурный ген интерферона встроен по *Eco*RI-концам в двух ориентациях. В клетках *E. coli* гибридные плазмиды серии pFRSn синтез интерферона не направляли. После трансформации клеток дрожжей синтез интерферона выявлен только в клонах, содержащих плазмиды ориентации I. Наибольшая продукция интерферона при этом регистрировалась для промотора 921 (табл. 12.3). Показано, что транскрипция с *ADH*1-промотора проходила через

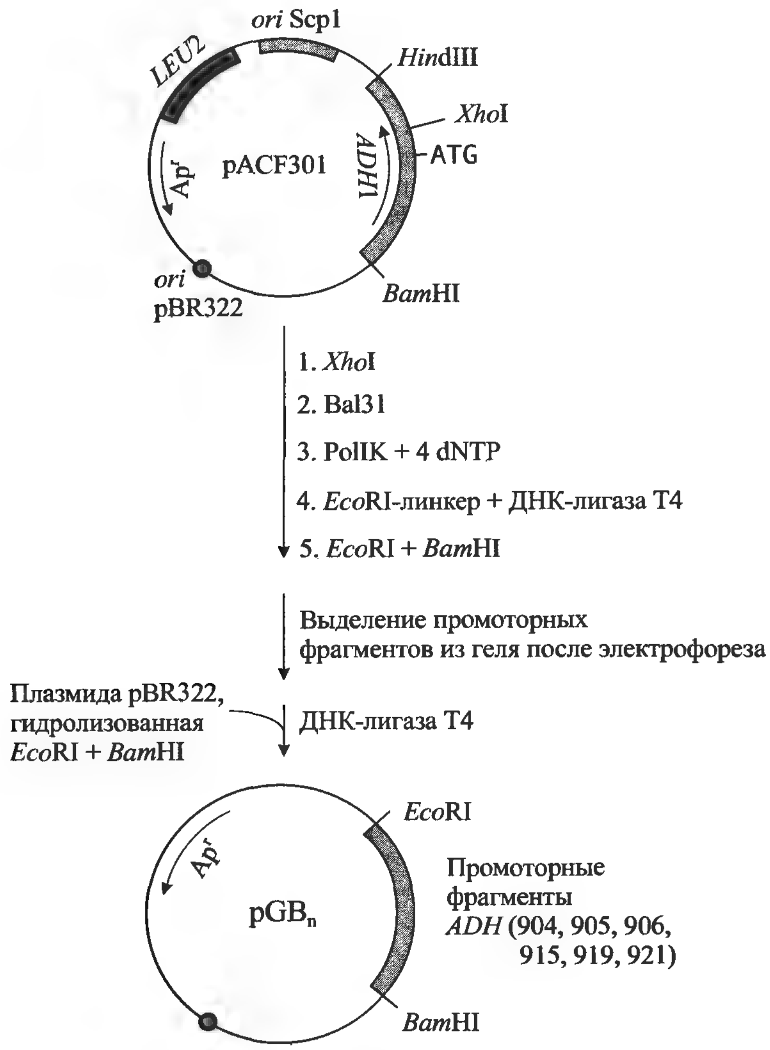


Рис. 12.25. Схема получения набора промоторных фрагментов на основе 5′-концевого района гена *ADH*1

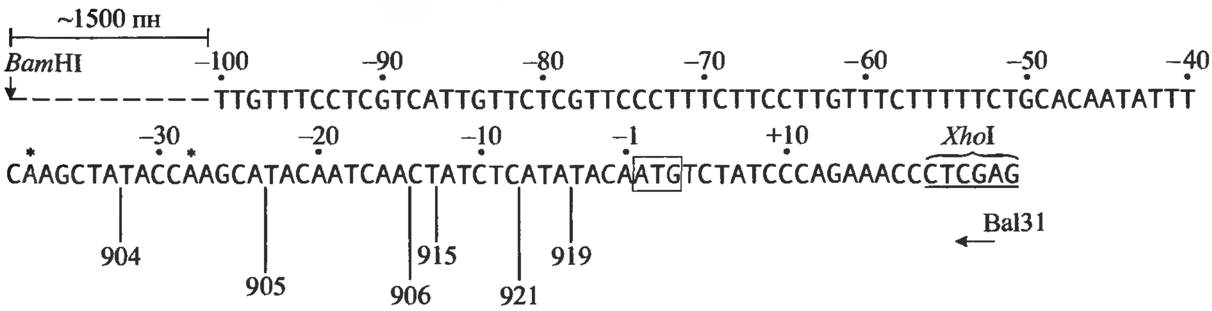


Рис. 12.26. Промоторные фрагменты на основе 5′-концевого района гена *ADH*1, полученные действием нуклеазы Bal31 после гидролиза pACF301 рестриктазой *Xho*I.

904–921 — номера фрагментов. К полученным фрагментам по тупым концам пришивали *Eco*RI-линкер. Звездочкой отмечены точки инициации транскрипции гена *ADH*1. Рамкой обведен инициаторный триплет

ген-эквивалент интерферона и прекращалась на терминаторе транскрипции гена *TRP*1 векторной плазмиды. Синтезируемый интерферон находился в цитоплазме дрожжей в несвязанном с мембранами клеток состоянии.

Варьируя условия культивирования клеток дрожжей и приготовления их экстрактов, авторам удалось повысить выход интерферона в несколько раз, и в итоге он составил 10^6 молекул на плазмидосодержащую клетку, что соответствует 1–2 % клеточного белка. Следует отметить, что гибридные плазмиды YRp-типа в процессе культивирования утрачиваются дрожжами с высокой частотой. При переносе гибридного гена

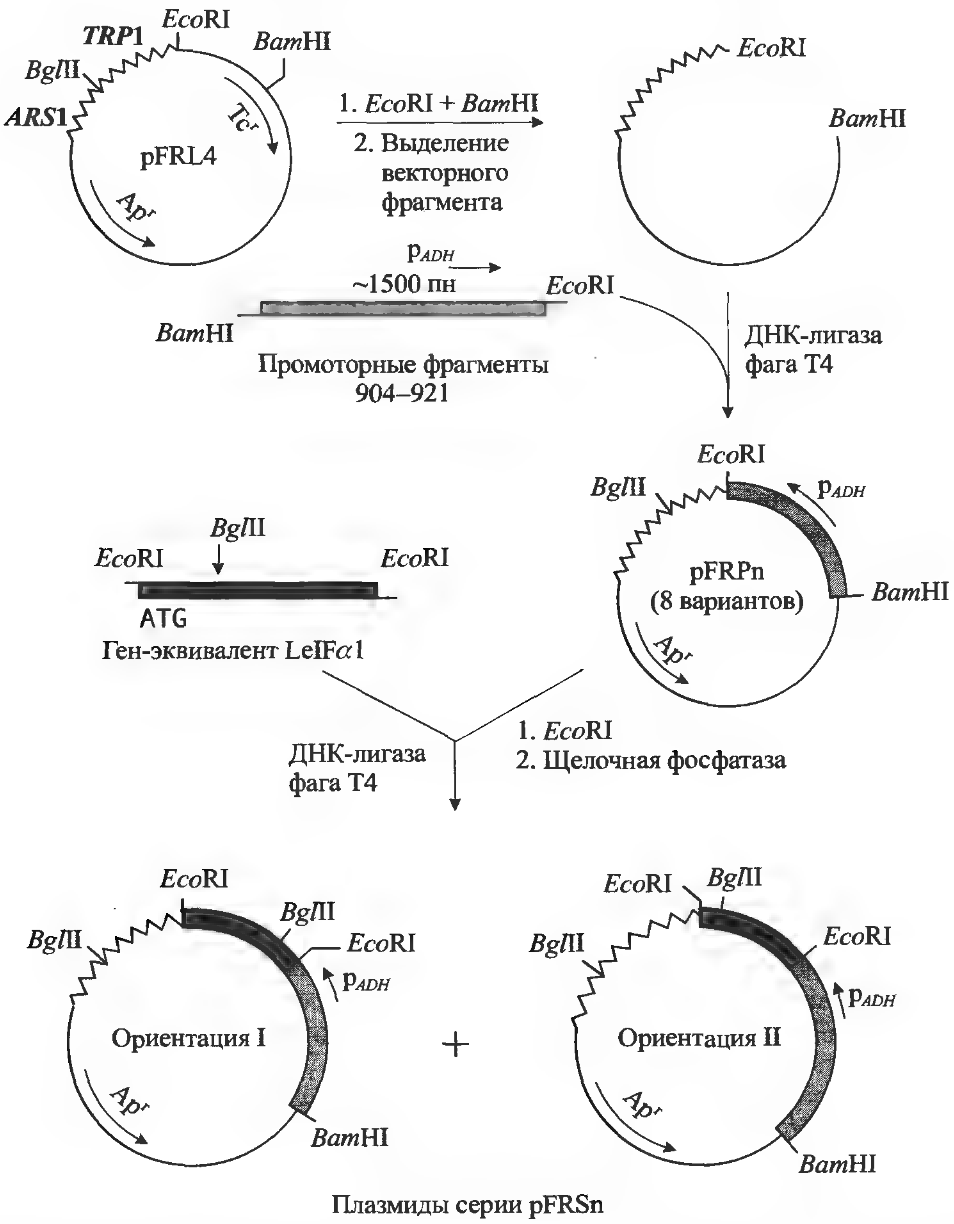


Рис. 12.27. Схема конструирования плазмид для экспрессии ген-эквивалента интерферона человека в клетках *S. cerevisiae*

ADH1–LeIF в вектор YEp-типа получены более стабильные трансформанты с высоким уровнем продукции интерферона.

В серии работ, выполненных в разных лабораториях, было показано, что для эффективной экспрессии в *S. cerevisiae* чужеродных кодирующих последовательностей необходимо состыковывать их не только с сильными дрожжевыми промоторами (5′-конец), но и со специфичными для дрожжей терминаторами транскрипции и сигналами полиаденилирования (3′-конец). Гибридная мРНК, имеющая специфичные дрожжевые 5′- и 3′-концевую последовательности, по-видимому, более стабильна и эффективно узнается дрожжевым белоксинтезирующим аппаратом.

Дрожжи-сахаромицеты имеют систему сплайсинга. Однако она несколько отличается от системы сплайсинга молекул пре-мРНК высших эукариот. Впервые это обнаружили Дж. Бегс с соавторами в 1980 г. при клонировании в плазмиде YEp-типа раздробленного хромосомного гена *β*-глобина кролика. В клетках дрожжей пре-мРНК этого гена не подвергалась сплайсингу. К. Лэнгфорд с соавторами (1983 г.) показали, что после встройки в клонированный раздробленный ген актина дрожжей интронсодержащего фрагмента гена *rp*51 дрожжевого рибосомного белка в клетках *S. cerevisiae* происходил синтез гибридной пре-мРНК, из которой затем наряду со своим правильно выщеплялся и встроенный интрон. При встройке же

Таблица 12.3. **Активность интерферона в экстрактах клеток дрожжей**

Фрагмент *ADH*1-промотора	Плазмида	Активность HuIFN · 10^{-3}, е. а./мл
904	pFRS3	47
905	pFRS7	47
906	pFRS12	125
915	pFRS23	125
919	pFRS34	94
921	pFRS35	250

в этот ген интронсодержащих последовательностей генов актина амебы или α-глобина утки на транскрибируемой гибридной пре-мРНК полный сплайсинг не происходил. Системой сплайсинга дрожжей эффективно выщеплялся лишь эндогенный интрон, а чужеродные последовательности сплайсингу не подвергались. Следует отметить, что экзон-интронная структура генов у *S. cerevisiae* встречается гораздо реже, чем у высших эукариот. Возможно, дрожжи-сахаромицеты имеют эволюционно более просто организованную систему сплайсинга.

Сделанные наблюдения показывают, что для экспрессии в клетках дрожжей чужеродные кодирующие последовательности предпочтительно должны быть непрерывными.

В настоящее время сконструирован многочисленный набор экспрессирующих векторных плазмид, предназначенных для дрожжей-сахаромицетов. Обычно они представляют собой плазмиды YEp-типа, в которых содержится сильный промотор, уникальный рестрикционный сайт для встройки ген-эквивалентов под контроль этого промотора, а также 3′-концевая часть какого-либо дрожжевого гена для формирования правильного 3′-конца синтезируемой гибридной мРНК (рис. 12.28). Чаще всего используют промоторы генов гликолитических ферментов *S. cerevisiae*. Это обусловлено тем, что они являются сильными конститутивными промоторами и детерминируют высокий уровень синтеза соответствующих мРНК и ферментов (индивидуальный ген может направлять синтез полипептида, составляющего до 5 % суммарного клеточного белка).

Все больший интерес вызывает создание управляемых экспрессирующих систем, так как конститутивная экспрессия чужеродного гена, клонированного в многокопийной плазмиде, приводит, как правило, к заметному метаболическому сдвигу в трансформированной клетке. В зависимости от природы гетерологичного продукта этот сдвиг может осложняться токсическими эффектами, различными как по механизму, так и по степени тяжести. В идеале включение экспрессии целевого клонированного гена должно происходить в тот момент, когда культура дрожжей выращена до достаточно высокой плотности. При этом запускающий такую

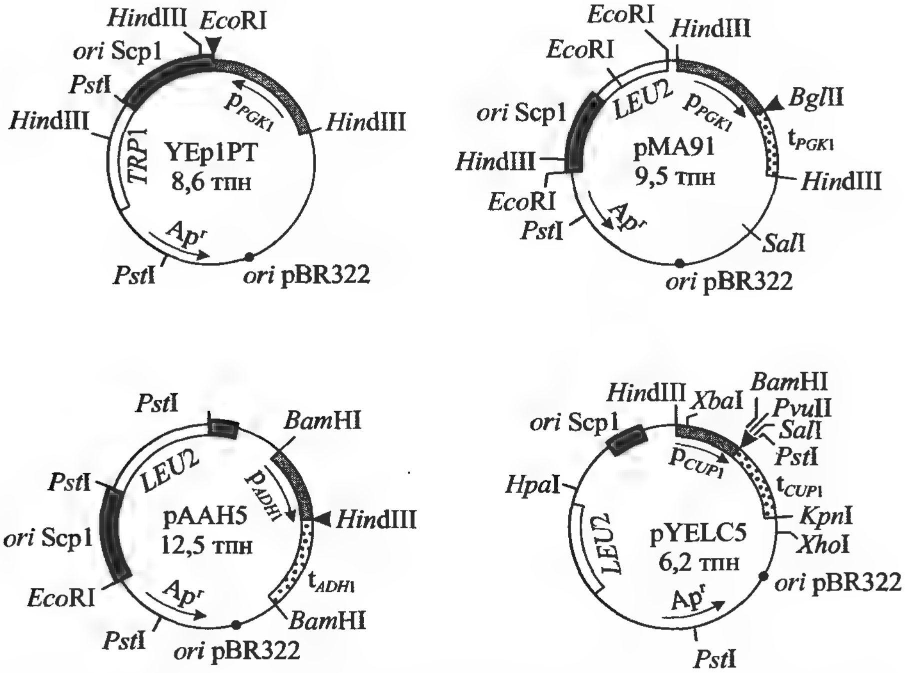


Рис. 12.28. Экспрессирующие векторные плазмиды дрожжей-сахаромицетов. Треугольниками обозначены места встройки целевых ген-эквивалентов

транскрипцию стимул должен быть достаточно простым.

В качестве одного из первых регулируемых промоторов был использован промотор гена *PHO*5 кислой фосфатазы *S. cerevisiae*. Транскрипция с этого промотора репрессируется неорганическим фосфатом. Поэтому при наличии в среде фосфатов как исходный ген *PHO*5, так и сконструированный на основе его промотора гибридный ген не экспрессируются. При перенесении клеток дрожжей на среду без фосфатов с промотора гена *PHO*5 индуцируется эффективная транскрипция.

Все шире в последние годы используют промотор гена *GAL*1. Данный промотор находится под катаболитной репрессией при росте клеток на среде, содержащей глюкозу. При перенесении клеток на среду с галактозой происходит индукция транскрипции, приводящая к 1000-кратному увеличению синтеза соответствующей мРНК. Следует отметить, что репрессия глюкозой транскрипции с промотора p_{GAL1} очень эффективна. Это подтверждает исследование Дж. Райна и Г. Барнеса (1985 г.), клонировавших ген-эквивалент рестриктазы *Eco*RI под контролем промотора гена *GAL*1 в плазмиде YCp-типа. На среде с глюкозой клетки дрожжей, содержащие сконструированную плазмиду, нормально растут, а после переноса на среду с галактозой погибают из-за индукции синтеза рестриктазы, которая расщепляет ДНК.

Промотор гена *CUP*1 (см. рис. 12.28, плазмида pYELC5) также является индуцируемым. Эффективная транскрипция с него индуцируется после добавления в среду растворимых солей меди (например $CuSO_4$).

Используя сильные промоторы и различные 3′-терминирующие районы, в клетках *S. cerevisiae* экспрессировали белки самого разного происхождения (табл. 12.4). Однако во многих случаях уровень синтеза чужеродных белков был заметно ниже ожидаемого. Так, при клонировании полного гена *PGK*1 в плазмиде YEp-типа продукция фосфоглицераткиназы достигает 30 % суммарного белка дрожжей. Замена кодирующей последовательности этого гена на гетерологичные ген-эквиваленты приводит к снижению уровня экспрессии на 1–2 порядка. Показано, что это связано с уменьшением стабильности синтезируемой гибридной мРНК. Таким образом, кроме элементов, прилегающих к структурному гену с 5′- и 3′-конца, важную информацию, определяющую уровень экспрессии гена, содержит сама по себе кодирующая последовательность.

Выбор триплетов для кодирования аминокислот в белке может быть одним из параметров, влияющих на экспрессию. Известно, что у дрожжей *S. cerevisiae* в активно экспрессируемых генах (*TDH*3, *PGK*1, *ADH*1) более 96 % аминокислот кодируются набором из 25 кодонов (из 61 возможного). Чужеродные гены имеют кодоновый состав, характерный для своего организма или ткани и, как правило, существенно отличаются по этому признаку от генов дрожжей. А. Хоэкэма с соавторами в 1987 г. решили проверить на примере гена *PGK*1, как выбор кодонов влияет на стабильность мРНК и эффективность трансляции. С помощью направленного мутагенеза, замены частей структурного гена синтетическими фрагментами был получен вариант гена *PGK*1, у которого остались неповрежденными концевые некодирующие районы, а все изменения выразились лишь в перекодировке аминокислотной последовательности фосфоглицераткиназы (табл. 12.5); аминокислотная последовательность белка при этом не изменилась. Замена кодонов на синонимичные минорные привела к снижению уровня синтеза фосфоглицераткиназы в 10 раз. Стабильность мРНК при этом уменьшилась в 3 раза. Авторы пришли к выводу, что снижение уровня синтеза белка связано с задержкой трансляционного комплекса на минорных кодонах. В свою очередь такие остановки приводят к уменьшению стабильности мРНК, а следовательно, к снижению в клетке числа молекул мРНК. Таким образом, обогащение структурного гена минорными кодонами обусловливает «кумулятивный» эффект, вызывающий значительное снижение уровня экспрессии гена. Очевидно, что для достижения максимально высокого выхода чужеродного белка в клетках дрожжей целесообразно осуществлять химико-ферментативный синтез ген-эквивалента, который отличается от природного тем, что в нем используются кодоны, наиболее употребимые в эффективно экспрессируемых генах *S. cerevisiae*.

Увеличения продукции чужеродных белков в клетках дрожжей можно добиться также стабилизацией (увеличением времени жизни) этих белков в гетерологичном окружении. В клетках всех эукариот продуцируется чрезвычайно консервативный по последовательности белок убиквитин (он идентичен, например, у человека и насекомых), имеющий размер 76 АК. Первоначально он синтезируется в виде белка-предшественника полиубиквитина, состоящего из нескольких тандемных повторов убиквитина, которые под действием специфичной эндопро-

Таблица 12.4. **Примеры экспрессии чужеродных ген-эквивалентов в составе гибридных плазмид с регулируемым промотором в клетках дрожжей-сахаромицетов**

Ген-источник		Продукт, детерминируемый клонированным ген-эквивалентом
промотора	3′-концевой области	
*PGK*1 (3-фосфоглицераткиназа)	*FLP* плазмиды Scp1	Интерферон α1 человека Интерферон α2 человека Интерферон γ человека
	*TRP*1 (N-5′-фосфорибозил-антранилатизомераза)	Поверхностный антиген вируса гепатита B
	*PGK*1	Поджелудочная липаза человека Сывороточный альбумин человека Прохимозин, химозин быка Растительный белок тауматин Запасной белок гороха легумин
*ADH*1 (алкогольдегидрогеназа)	*TRP*1	Интерферон α1 человека Поверхностный антиген вируса гепатита B
	*ADH*1	Антитромбин III человека Гемагглютинин вируса гриппа Люцифераза светлячка β-Глюканаза *Bacillus subtilis* α-Амилаза *Bacillus amyloliquefaciens*
*TDH*3 (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа)	*ARG*3 (орнитин-карбамоил-трансфераза)	Ингибитор α_1-протеиназы человека
	*ADH*1 *TDH*3	Эпидермальный фактор роста человека Липокортин морской свинки Цитохром С человека
*PHO*5 (кислая фосфатаза)	—	Поверхностный антиген вируса гепатита B α-Неоэндорфин α-Фетопротеин крысы
*GAL*1 (галактокиназа)	*ADH*1	Антитромбин III человека
	*SUC*2 (инвертаза)	Прохимозин быка
	—	Запасной белок кукурузы зеин Рестриктаза *Eco*RI
*CUP*1 (металлотионеин)	*CYC*1 (*изо*-1-цитохром С)	Протеазный домен урокиназы человека Убиквитин
	*CUP*1	Белок VP2 вируса инфекционного бурсального заболевания кур
MFα1 (α-фактор)	*ADH*1	Интерферон α2 человека Интерферон β1 человека Соматостатин Эпидермальный фактор роста человека β-Галактозидаза *E. coli*
*ARG*3	*ARG*3	α_1-Антитрипсин человека
*SUC*2	—	Интерферон α2 человека
Actin (актин)		Поверхностный антиген вируса гепатита B

теазы (Ub-Хазы) эффективно выщепляются. Убиквитин находится в клетках как в свободном, так и в связанном с другими белками состоянии. Он способен ковалентно объединяться своим С-концевым остатком с ε-аминогруппами лизиновых остатков других белков, например, с внутренним лизином (119) на гистоне Н2А. Данная реакция катализируется специфичным клеточным ферментом. В цитоплазме убиквитин отвечает за селективную деградацию внутриклеточных белков.

А. Варшавский с соавторами (1986 г.) клонировали в *E. coli* фрагмент хромосомной дрожжевой ДНК, содержащий тандемные по-

Таблица 12.5. **Использование кодонов в гене *PGK*1 и его искусственном варианте *pgk*10**

Кодон/аминокислота	Частота встречаемости		Кодон/аминокислота	Частота встречаемости	
	в *PGK*1	в *pgk*10		в *PGK*1	в *pgk*10
UUU/Phe[1]	1	6	UAU/Tyr[1]	0	5
UUC/Phe	18	13	UAC/Tyr	7	2
UUA/Leu	5	4	UAA/Stop	1	1
UUG/Leu	36	18	UAG/Stop	0	0
CUU/Leu	0	0	CAU/His[1]	1	6
CUC/Leu[1]	0	19	CAC/His	7	2
CUA/Leu	0	0	CAA/Gln	8	4
CUG/Leu	0	0	CAG/Gln[1]	0	4
AUU/Ile	9	7	AAU/Asn[1]	1	8
AUC/Ile	14	9	AAC/Asn	13	6
AUA/Ile[1]	0	7	AAA/Lys[1]	2	16
AUG/Met	4	4	AAG/Lys	40	26
GUU/Val	16	7	GAU/Asp[1]	8	13
GUC/Val	22	13	GAC/Asp	18	13
GUA/Val[1]	0	17	GAA/Glu	28	16
GUG/Val	0	1	GAG/Glu[1]	1	13
UCU/Ser	16	8	UGU/Cys	1	0
UCC/Ser	6	3	UGC/Cys[1]	0	1
UCA/Ser	2	0	UGA/Stop	0	0
UCG/Ser[1]	0	14	UGG/Trp	2	2
CCU/Pro	0	0	CGU/Arg	3	1
CCC/Pro	0	0	CGC/Arg	0	0
CCA/Pro	17	10	CGA/Arg	0	0
CCG/Pro[1]	0	7	CGG/Arg[1]	0	8
ACU/Thr	10	9	AGU/Ser	0	0
ACC/Thr	8	6	AGC/Ser	2	1
ACA/Thr	0	0	AGA/Arg	10	4
ACG/Thr[1]	0	3	AGG/Arg	0	0
GCU/Ala	32	23	GGU/Gly	35	29
GCC/Ala	10	7	GGC/Gly	1	1
GCA/Ala	1	1	GGA/Gly[1]	0	6
GCG/Ala[1]	0	12	GGG/Gly	1	1

[1] Использованные в *pgk*10 минорные кодоны.

вторы ген-эквивалента убиквитина. Выщепив один такой повтор, его подстроили к 5′-концу структурного гена *β*-галактозидазы (*lacZ*) *E. coli*. Полученную гибридную кодирующую последовательность поместили под контроль промотора гена *GAL*1 в векторе YEp-типа. В клетках *S. cerevisiae* гибридная плазмида направляла синтез химерного белка Ub–*β*-Gal, который точно расщеплялся Ub-Хазой на Ub и *β*-Gal. При этом время полужизни *β*-галактозидазы не изменялось. Методом направленного мутагенеза первый остаток Met *β*-галактозидазы в составе гибридного гена последовательно был заменен на другие аминокислотные остатки. Во всех случаях, кроме замены на остаток пролина, убиквитин эффективно и точно отщеплялся от химерного белка в клетках дрожжей эндогенной Ub-Хазой.

Этим результатом воспользовались Д. Экер с соавторами (1987 г.). Сначала они химически синтезировали ген-эквивалент убиквитина, при этом осуществили перекодировку, удалив из последовательности гена убиквитина кодоны, которые редко встречаются в активно экспрессируемых генах дрожжей. Синтетический ген встроили в экспрессирующий вектор под контроль индуцируемого промотора гена *CUP*1 и с 3′-конца ограничили его терминатором транскрипции гена *CYC*1. В условиях индукции была получена суперпродукция убиквитина.

При этом токсический эффект от сверхсинтеза белка в клетках дрожжей не наблюдался.

На следующем этапе (1989 г.) синтетический ген-эквивалент убиквитина состыковали с 5'-концами ген-эквивалентов ряда эукариотических белков: α-субъединицы стимулирующего G-белка аденилатциклазного комплекса млекопитающих ($G_s\alpha$), растворимого фрагмента рецепторного белка Т-клеток (sCD4) и протеазного домена урокиназы (UKP) человека. Гибридные гены встроили в экспрессирующий вектор с промотором гена *CUP*1 и ввели в клетки дрожжей. Параллельно были созданы конструкции на основе того же экспрессирующего вектора, в который встроили ген-эквиваленты указанных выше эукариотических полипептидов без кодирующей последовательности убиквитина. В клетках *S. cerevisiae* убиквитин точно и эффективно отщеплялся от химерных белков и, более того, обеспечивал суперпродукцию состыкованных с ним полипептидов. Так, прямая экспрессия протеазного домена урокиназы не выявлялась, а слияние с убиквитином обеспечивало продукцию UKP до уровня 2 % суммарного клеточного белка. Аналогично наблюдалось значительное возрастание продукции sCD4 и $G_s\alpha$ в результате слияния с убиквитином.

Механизм, который обеспечивает увеличение продукции целевых белков, слитых с убиквитином как с «лидерной» последовательностью, не ясен. По-видимому, убиквитин может защищать N-конец белка от протеолиза или обеспечивать перенос белка в такой компартмент клетки, где он защищен от действия экзопротеаз. Возможен также какой-то другой механизм.

Рассмотренный подход чрезвычайно перспективен для создания на основе *S. cerevisiae* штаммов — суперпродуцентов белков. При этом после количественного отщепления убиквитина целевой белок не содержит N-концевого метионина, который необходим при прямом синтезе этого белка с клонированного ген-эквивалента.

Таким образом, используя многокопийный молекулярный вектор с регулируемым сильным промотором, синтетический ген-эквивалент чужеродного белка, состоящий из мажорных дрожжевых кодонов и состыкованный на 5'-конце в правильной рамке трансляции с кодирующей последовательностью убиквитина, а также 3'-концевой некодирующий район какого-либо дрожжевого гена, можно сконструировать гибридную плазмиду, которая в клетках *S. cerevisiae* будет направлять сверхсинтез целевого чужеродного белка. Оптимизируя условия культивирования, выход чужеродного белка можно дополнительно увеличить.

12.5.2. Секреция чужеродных белков из клеток *S. cerevisiae*

Многие биологически активные белки высших эукариот синтезируются в форме предшественников, подвергающихся секреции из клеток. В ряде экспериментов было обнаружено, что если белки такого типа (например, гормон роста быка, активатор тканевого плазминогена человека, γ-интерферон человека, прохимозин быка) в процессе синтеза в бактериальной или дрожжевой клетке остаются в цитоплазме, то они переходят в нерастворимую и неактивную форму. Поэтому создание продуцентов, обеспечивающих секрецию и сопутствующую ей модификацию белка, является крайне важной задачей генетической инженерии и биотехнологии. Большое внимание уделяется дрожжам, у которых ряд белков эффективно выводится из клеток в окружающую среду. В отличие от бактерий в клетках дрожжей в процессе секреции может происходить гликозилирование и правильная «укладка» эукариотических белков. Особо следует отметить, что большинство штаммов *S. cerevisiae* не выделяет в культуральную среду протеазы, что в еще большей степени повышает перспективность данной системы для создания высокопродуктивных штаммов, секретирующих в окружающую среду целевые белки.

Секретируемые белки эукариотических клеток синтезируются на рибосомах, связанных с мембранами шероховатого эндоплазматического ретикулума (рис. 12.29). Секрецию белка направляет сигнальный пептид. В процессе секреции пре-белок проходит в полость эндоплазматического ретикулума (ЭР), и от него отщепляется сигнальный пептид. В полости ЭР белок подвергается первичному гликозилированию при наличии в его последовательности участков гликозилирования, имеющих структуру Asn–X–Ser или Asn–X–Thr (X — любая аминокислота).

В большинстве случаев к белкам в ЭР присоединяется олигосахарид только одного типа, состоящий из N-ацетилглюкозамина, маннозы и глюкозы, и он связывается с NH_2-группой боковой цепи остатка аспарагина (рис. 12.30). Все обнаруженные в зрелых гликопротеинах олигосахариды, связанные таким способом с аспарагином, образуются в результате различных модификаций этого олигосахарида-предшествен-

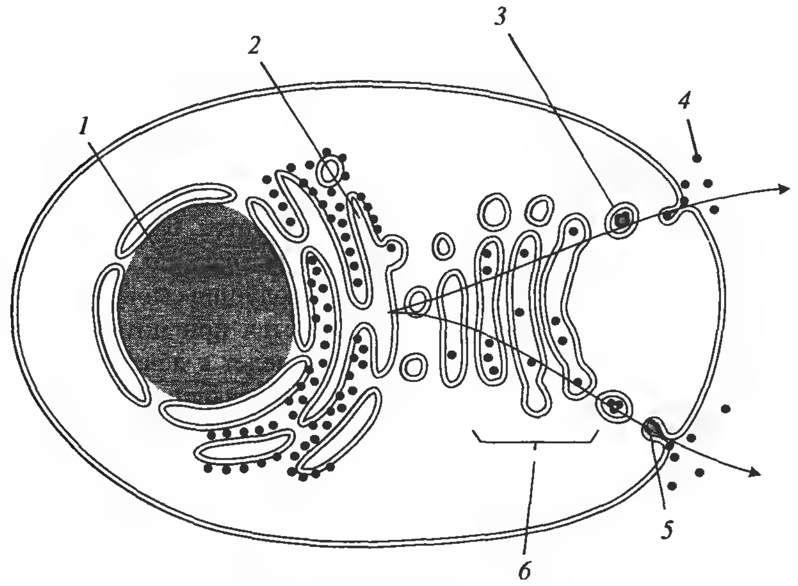


Рис. 12.29. Путь секретируемого белка в эукариотической клетке:

1 — ядро; *2* — шероховатый эндоплазматический ретикулум; *3* — секреторный пузырек; *4* — секретируемый белок; *5* — секреторный пузырек в момент экзоцитоза; *6* — аппарат Гольджи

ника. Обычно его модификация происходит во время перемещения гликопротеина через аппарат Гольджи (см. рис. 12.29). В аппарат Гольджи белки переносятся из ЭР с помощью отпочковывающихся от ЭР транспортных пузырьков. После прохождения через аппарат Гольджи и модификации белок в составе секреторного пузырька транспортируется к плазматической мембране. Пузырек сливается с мембраной и «выбрасывает» наружу свое содержимое.

Клетки дрожжей окружены жесткой клеточной стенкой, поэтому далеко не все секретируемые через плазматическую мембрану белки выходят из клеток в окружающую среду. Например, инвертаза и кислая фосфатаза переносятся в периплазматическое пространство дрожжевых клеток, а половой феромон α-фактор и киллерный токсин, кодируемый двухцепочечной РНК, секретируются в окружающую среду.

Несмотря на сходство механизма секреции белков у дрожжей и клеток животных, дрожжи, по-видимому, имеют определенные особенности, касающиеся специфичности данного процесса. Так, Р. Хитземан с соавторами (1984 г.) обнаружили, что при синтезе пре-белка гормона роста человека (hGH) в дрожжах лишь 10 % его процессируется и секретируется, в то время как бóльшая часть данного белка остается в непроцессированной форме внутри клетки. В этой же лаборатории показано, что пре-белок интерферона $\alpha2$ человека (HuIFN-$\alpha2$) в клетках дрожжей процессируется, образуя три дискретные формы. Состыковав структурный ген HuIFN-$\alpha2$ с ген-эквивалентом сигнального пептида дрожжевого белка инвертазы (1986 г.), получили эффективный и правильный процессинг химерного пре-белка (рис. 12.31). Необходимо отметить, что в обоих случаях в среду выходила лишь небольшая часть секретированного из цитоплазмы белка, по-видимому, из-за барьера клеточной стенки.

На примере химер, у которых к сигнальному пептиду инвертазы подстроен ген-эквивалент сывороточного альбумина либо инсулиноподобного фактора роста I человека, также было показано, что прилегающие к С-концу сигнального пептида последовательности чужеродных белков не влияют на точность его отщепления. По-видимому, вся информация, необходимая для процессинга этих белков при секреции, заключена в последовательности сигнального пептида инвертазы.

В некоторых случаях чужеродный сигнальный пептид может полностью функционировать в клетках дрожжей. Так, К. Томсен (1983 г.) обнаружил, что пре-пептида α-милазы мыши в клетках *S. cerevisiae* направляет эффективную секрецию α-амилазы в окружающую среду. При этом в отобранных клонах из клеток выходило до 90 % синтезированного фермента, и дрожжи приобретали способность утилизировать крахмал. Затем (1986 г.) ген-эквивалент сигнального пептида α-амилазы был состыкован с кодирующей последовательностью β-глюканазы ячменя. Гибридная последовательность, встроенная в векторной плазмиде под контроль промотора

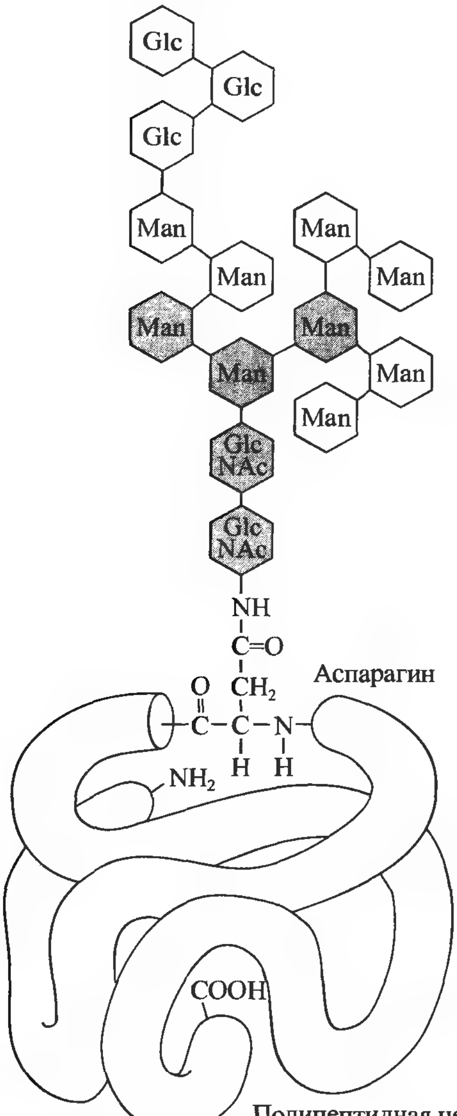


Рис. 12.30. Структура связанного с аспарагином олигосахарида, который присоединяется к большинству белков в полости эндоплазматического ретикулума.

Выделенные звенья образуют кор (сердцевину) олигосахарида. После процессинга олигосахаридов в аппарате Гольджи во многих гликопротеинах остаются только сахара, образующие кор. Man — манноза, Glc — глюкоза, GlcNAc — N-ацетилглюкозамин

гена *ADH*1, направляла продукцию в дрожжах химерного белка, β-глюканазная часть которого эффективно секретировалась в культуральную среду.

М. Брокер с соавторами (1987 г.) также продемонстрировали, что в клетках дрожжей сигнальный пептид антитромбина III человека правильно выполняет свои функции и обеспечивает эффективную секрецию гликозилированного антитромбина в культуральную среду.

Таким образом, белки животного происхождения иногда могут полноценно секретироваться из клеток дрожжей, используя собственные сигнальные пептиды. Но более надежным подходом является использование молекулярных векторов экспрессии–секреции, созданных на основе генетических элементов *S. cerevisiae*.

В процессе выведения из клеток белки гликозилируются. Кроме того, секреция препятствует образованию нерастворимых конгломератов продуцируемого белка, которое часто наблюдается при цитоплазматической локализации и ведет к денатурации белка. Таким образом, при секреции в дрожжах обычно удается получать чужеродный белок в форме, максимально приближенной к природной.

Кроме ген-эквивалента сигнального пептида инвертазы для создания векторов секреции активно используют лидерную последовательность α-фактора. Данный феромон состоит из 13 АК и первоначально синтезируется со структурного гена *MFα*1 как часть белка-предшественника размером 165 АК (рис. 12.32). Данный белок на N-конце содержит сигнальный пептид из 19 АК, который расщепляется при секреции пре-пробелка в ЭР. За сигнальным пептидом следует пропоследовательность длиной 64 АК, имеющая три участка гликозилирования. Точная функция пропоследовательности не выяснена. Предполагают, что она может усиливать секрецию белка в окружающую среду. α-Фактор в белке-предшественнике представлен четырьмя повторами, разделенными спейсерными пептидами. В протеолитический процессинг про-α-фактора вовлечено три протеазы: эндопептидаза (кодируется геном *KEX*2), расщепляющая С-концевую связь после дипептида Lys–Arg; дипептидиламинопептидаза (ген *STE*13), удаляющая пары Glu–Ala; карбоксипептидаза, отщепляющая в процессе окончательного созревания α-фактора остатки Arg и Lys.

После того как стала ясна картина процессинга пре-про-α-фактора, в ряде лабораторий (1984 г.) предприняли попытки создать векторы секреции на основе промотора и пре-пропоследовательности α-фактора. Сразу же после сайта расщепления Lys–Arg в положении 85 пре-про-α-фактора поместили ген-эквиваленты эпидермального фактора роста человека, интерферона α1 человека или колониестимулирующего фактора гранулоцитов и макрофагов человека. Во всех случаях из клеток дрожжей в среду секретировались зрелые формы белков человека, от которых были точно отщеплены пре-пропоследовательности α-фактора.

Вследствие нестабильности многокопийных векторных плазмид в *S. cerevisiae* создан-

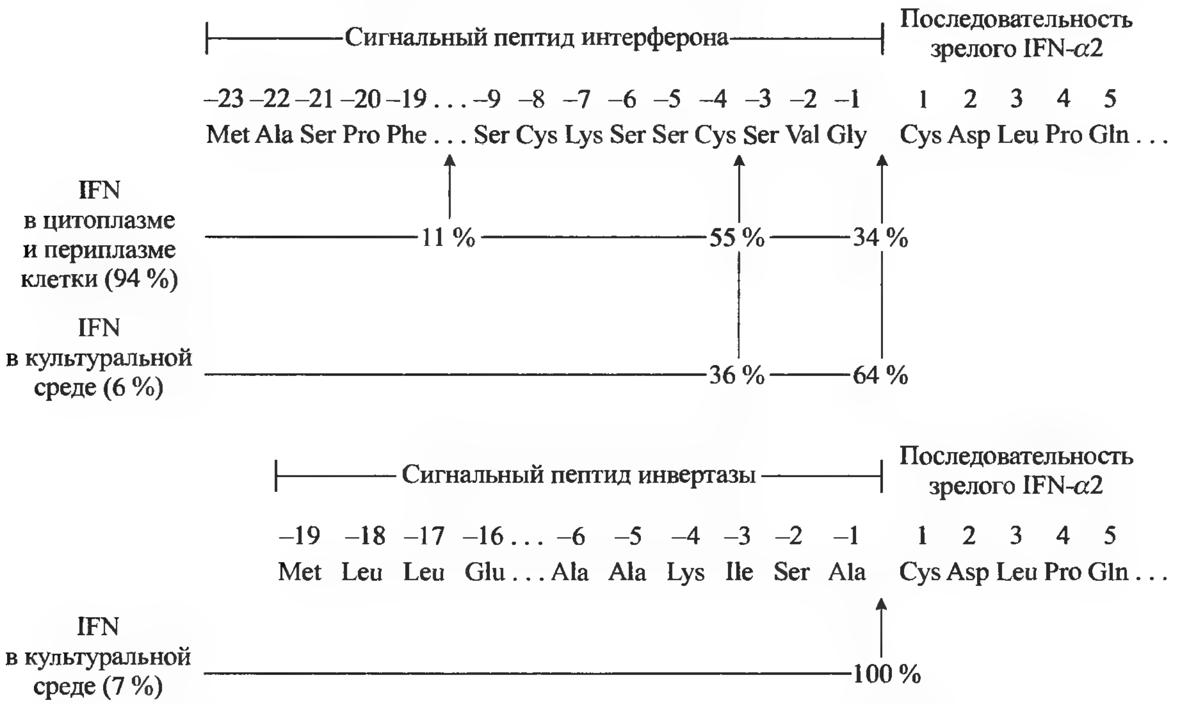


Рис. 12.31. Процессинг пре-интерферонов с разными сигнальными пептидами и распределение продуктов процессинга в *S. cerevisiae*

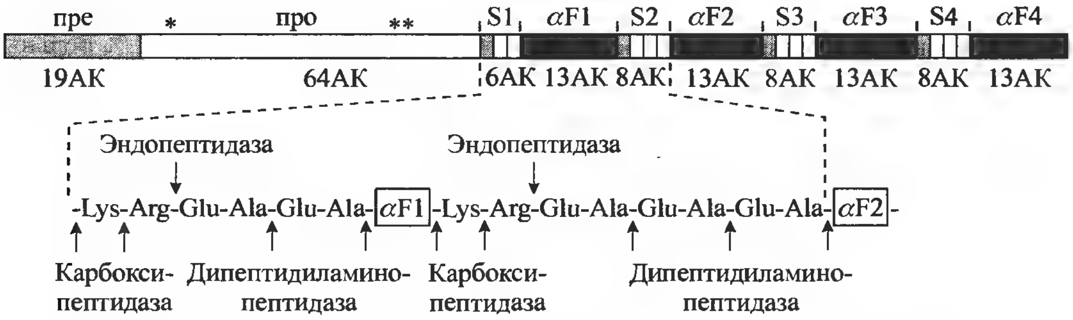


Рис. 12.32. Структура пре-про-α-фактора *S. cerevisiae* и схема его процессинга. Звездочками обозначены участки гликозилирования пробелка

ные штаммы малопригодны для технологического использования. Поэтому Р. Смит с соавторами (1985 г.) в составе плазмиды интеграции внедрили в геном дрожжей гибридные гены и получили высокостабильные штаммы, продуцирующие и секретирующие чужеродные белки. Оказалось, что в этом случае в окружающую среду секретируется значительно больше синтезируемого белка (8–10 %), чем при экспрессии тех же генов в составе плазмидных векторов (1–2 %). Этим же авторам удалось получить мутанты *S. cerevisiae*, обеспечивающие более эффективную секрецию белков во внешнюю среду. Возможно, эти мутации затрагивают строение клеточной стенки. На их основе были созданы штаммы дрожжей с хромосомной локализацией гибридных генов, секретирующие в культуральную среду до 80 % синтезируемых белков человека.

Подавляющее большинство белков животных, ген-эквиваленты которых встраивали в векторы экспрессии–секреции дрожжей, являются секретируемыми в организме-хозяине и имеют относительно небольшой размер. Именно поэтому данные белки, состыкованные с функциональным в дрожжах сигнальным пептидом, эффективно секретировались через плазматическую мембрану и частично выходили в культуральную среду.

Р. Дэс соавторами в 1989 г. на примере крупного (116 кДа) цитоплазматического белка — β-галактозидазы *E. coli* — решили проверить, насколько универсален разработанный подход к экспрессии–секреции чужеродных белков из

клеток *S. cerevisiae*. С ген-эквивалентом препропоследовательности α-фактора в правильной рамке трансляции соединили кодирующую последовательность β-Gal. Оказалось, что β-Gal в клетках дрожжей секретировалась, но оставалась в периплазме. Таким образом, пре-пропоследовательность α-фактора обеспечивает секрецию из цитоплазмы дрожжей белков разных типов и размеров. В свою очередь, возможность выхода в окружающую среду зависит от самого секретируемого белка, т. е. от его способности преодолевать барьер клеточной стенки. Дж. Эрнст (1988 г.) показал, что для обеспечения секреции чужеродных белков в клетках дрожжей может быть достаточно одной пре-последовательности α-фактора.

Важной особенностью дрожжей *S. cerevisiae* является то, что они секретируют в окружающую среду мало белков, и это упрощает процедуру очистки целевого чужеродного белка, экспрессируемого и секретируемого из клеток.

Многие из белков человека и животных, представляющих терапевтический интерес, секретируются клетками одних типов, тогда как действие их направлено на другие клетки. Эти белки часто бывают богаты цистеином, а множественные дисульфидные связи служат основным препятствием для успешной ренатурации полипептидов, продуцируемых бактериями. Секреция дрожжами белков, которые в норме секретируются клетками млекопитающих, обычно сопряжена с правильным формированием дисульфидных связей и, как следствие, с сохранением этими белками биологической активности.

При наличии ряда явных преимуществ дрожжей *S. cerevisiae* как системы экспрессии–секреции белков животных перед бактериальными системами они имеют и некоторые недостатки. Как уже отмечалось, аппарат гликозилирования представляет собой часть аппарата секреции эукариотических клеток. Внутренний углеводный кор собирается после транслокации продукта в эндоплазматический ретикулум, а наружная цепь формируется в аппарате Гольджи. В дрожжевых клетках гликозилирование наружных цепей происходит иначе, чем в клетках млекопитающих. Как это может сказаться на свойствах конкретных белков, требует систематического изучения.

Для ряда белков человека характерна такая модификация, которая не может быть реализована в дрожжах. Например, многие белки, участвующие в процессах свертывания крови, подвергаются γ-карбоксилированию по остаткам глутаминовой кислоты, а в дрожжах такой системы посттрансляционной модификации белков нет.

Преодолеть указанные затруднения можно лишь при экспрессии клонированных генов в гомологичной системе. Поэтому внимание исследователей наряду с оптимизацией генно-инженерной системы дрожжей привлекает разработка методов клонирования и экспрессии генов в клетках высших эукариот.

12.5.3. Продукция чужеродных белков в *S. cerevisiae*

Многие вопросы, касающиеся экспрессии чужеродных генов в клетках *S. cerevisiae*, освещены в предыдущих разделах данной главы. Здесь рассмотрим некоторые примеры продукции дрожжами экзогенных белков, имеющих важное значение для современной биотехнологии.

Шумного первого успеха генетическая инженерия дрожжей-сахаромицетов добилась благодаря созданию штаммов — продуцентов поверхностного антигена вируса гепатита В (HBV). Гепатит В — самое тяжелое заболевание из всех вирусных гепатитов. В некоторых странах на его долю приходится половина всех случаев гепатита. От 5 до 10 % больных, зараженных вирусом гепатита В, становятся хроническими носителями этого возбудителя, что в итоге приводит к развитию у них цирроза печени или гепатоцеллюлярной карциномы. Число хронических носителей вируса гепатита В в мире составляет около 350 млн человек, что соответствует 5 % населения земного шара. У хронических носителей риск развития гепатоцеллюлярной карциномы в 100–200 раз выше, чем у неинфицированных людей. Число смертей, вызванных HBV, оценивается величиной около 1 млн ежегодно. Все это обусловливает большую потребность в вакцине против гепатита В.

Сложность решения данной проблемы состоит в том, что вирус гепатита В не удается выращивать в культуре клеток и мелкие лабораторные животные к нему невосприимчивы. Инфекцию HBV можно моделировать только на обезьянах шимпанзе, а они редки и очень дороги.

Первая вакцина против гепатита В была получена из плазмы крови хронических носителей антигенов данного вируса. Вирус гепатита В представляет собой частицу диаметром 42 нм, содержащую кольцевую двухцепочечную ДНК. Заражение HBV можно установить по наличию трех основных антигенных маркеров: поверхностного антигена вируса гепати-

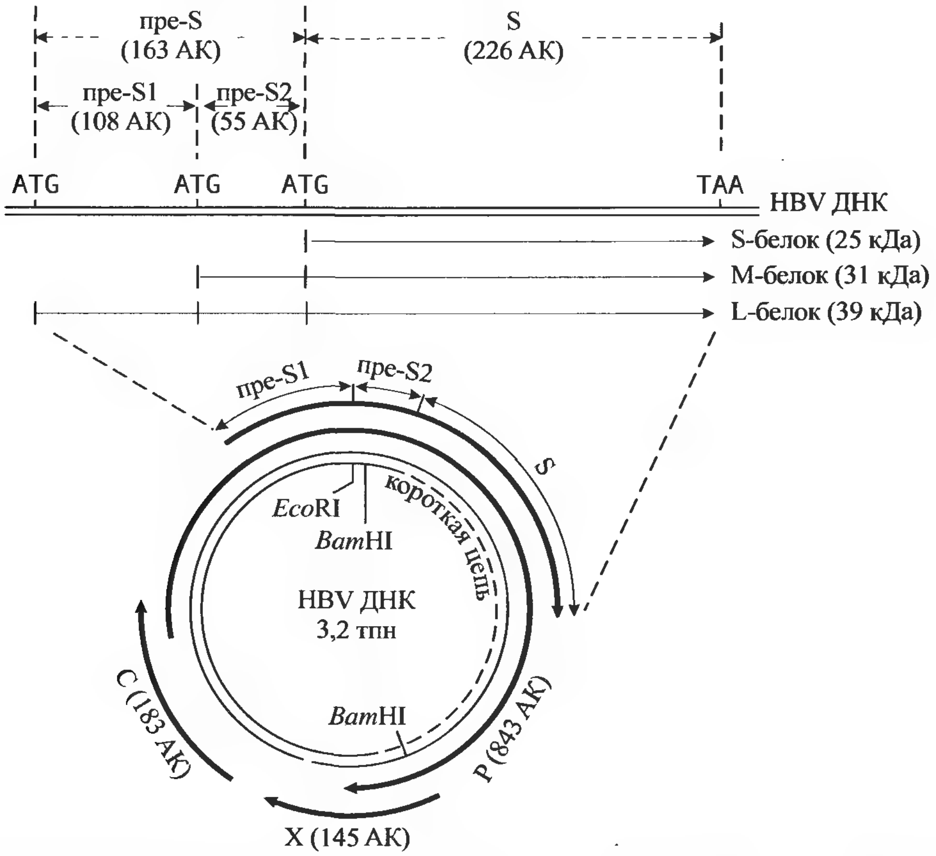


Рис. 12.33. Карта генома вируса гепатита В и структурная организация области, кодирующей HBsAg. Вирусные белки: S — HBsAg; С — HBcAg; Р — ДНК-полимераза; X — регуляторный белок HBx. Толстыми стрелками указаны ОРТ

та В (HBsAg), сердцевинного (корового) антигена (HBcAg) и антигена е (HBeAg), вырабатывающегося в процессе репликации вируса в гепатоцитах. Поверхностный антиген — это гликопротеин, который присутствует в зараженном организме не только в составе вирионов, но и в виде сферических частиц диаметром 18–22 нм, образующихся в результате самосборки молекул HBsAg. Обнаружилось, что данные частицы поверхностного антигена, очищенные от других компонентов вируса, способны при введении в организм шимпанзе и человека вызывать иммунный ответ, защищающий от последующей вирусной инфекции.

Для получения вакцины против гепатита В плазму крови инфицированных лиц фракционируют и инактивируют таким образом, чтобы получаемый препарат HBsAg не содержал инфекционного HBV. Кроме того, необходимо исключить вероятность заражения другими вирусами (включая вирус иммунодефицита человека, вызывающий развитие СПИДа), которые могут присутствовать в плазме доноров. Таким образом, плазма крови должна быть подвергнута многочисленным тщательным анализам, и лишь затем из отобранных образцов можно выделять HBsAg. Ограниченность источников пригодной плазмы, сложность получения и тестирования такой субъединичной вакцины привели к тому, что она имела высокую стоимость и не могла сколько-нибудь заметно удовлетворить существующие в ней потребности.

В 1979 г. Ф. Галиберт с соавторами проклонировали в *E. coli* ДНК вируса гепатита В и расшифровали ее первичную структуру. На карте генома HBV (рис. 12.33) удалось локализовать гены, кодирующие HBsAg, HBcAg и вирусную ДНК-полимеразу.

Вирионы HBV содержат кольцевую частично двухцепочечную молекулу ДНК. Одноцепочечные участки составляют в разных молекулах от 15 до 60 % их длины. Таким образом, ДНК состоит из длинной цепи L, которая имеет постоянный размер (3220 нуклеотидов) во всех молекулах, и короткой цепи S, которая в разных молекулах варьирует по длине (1700–2800 нуклеотидов). В инфицированных клетках вирусная ДНК-полимераза достраивает вторую цепь и полностью двухцепочечная ДНК подвергается репликации.

После того как была определена кодирующая последовательность HBs-антигена, в разных лабораториях предприняли попытки создать штаммы — продуценты вирусного антигена на основе *E. coli*, а затем и других видов бактерий. Однако ни в одном случае не удалось получить положительный результат. По-видимому, это обусловлено токсичностью данного вирусного белка для бактерий. Успеха добились П. Валензуэла с соавторами (1982 г.), а затем Р. Хитземан с соавторами (1983 г.), которые экспрессировали ген-эквивалент поверхностного антигена в клетках дрожжей. В первой работе кодирующую последовательность белка S (см. рис. 12.33) встроили в челночную плазмиду под контроль промотора гена *ADH1* и с 3′-конца ее ограничили терминатором транскрипции гена *TRP1*. Во второй работе транскрипция гибридного гена инициировалась с промотора гена *PGK1*, а терминатор был использован тот же. В обоих случаях синтез белка S проходил эффективно и, более того, вирусный антиген собирался в цитоплазме клеток *S. cerevisiae* в частицы размером 17–20 нм (S-частицы). Правда, эти частицы составляли лишь 2–5 % суммарной продукции данного вирусного белка в клетках дрожжей. Но этого оказалось достаточно, чтобы из экстракта клеток дрожжей штамма-продуцента можно было относительно просто выделить препарат HBs-антигена. Проверка показала, что этот препарат обладает теми же иммуногенными свойствами, что и плазменная вакцина против гепатита B, хотя в дрожжах синтезировалась негликозилированная форма HBsAg. Шимпанзе, иммунизированные данным рекомбинантным антигеном, оказались устойчивыми к заражению живым HBV в количестве, составляющем 1000 инфекционных доз.

Возможность крупномасштабной ферментации дрожжей на простых средах и последующего выделения S-частиц из экстрактов клеток с их очисткой позволила радикально увеличить производство данной субъединичной вакцины и значительно снизить ее стоимость. Более того, отпала необходимость контроля получаемых препаратов на загрязненность другими вирусами, что дополнительно удешевило процедуру.

Проверка на добровольцах также показала, что рекомбинантная субъединичная вакцина на основе S-частиц эффективно индуцирует в организме человека иммунный ответ против вируса гепатита B. Данная вакцина, названная вакциной второго поколения против гепатита B, явилась первой генно-инженерной вакциной, внедренной в массовом масштабе в практику здравоохранения.

Детальное изучение белков оболочки HBV показало, что наряду с основным белком S в существенных количествах в вирион входят белки M (пре-S2 + S) и L (пре-S1 + пре-S2 + S). Последние белки, по-видимому, синтезируются при инициации трансляции с соответствующих инициаторных кодонов AUG (см. рис. 12.33). Особое внимание исследователей привлекла область пре-S2, так как в 1986 г. было показано, что антитела к пре-S2 нейтрализуют вирус гепатита B и, более того, вакцина на основе синтетического пептида пре-S2 защищала шимпанзе от инфекции HBV.

Исходя из этих наблюдений предположили, что белок M при инъекции в организм будет обусловливать появление антител как против белка S, так и против последовательности пре-S2. Поэтому Я. Фуджисава с соавторами в 1989 г. предприняли попытку создать штамм дрожжей, продуцирующий белок M вируса гепатита B. При прямой экспрессии кодирующей последовательности пре-S2–S белок M в районе пре-S2 быстро гидролизовался, и поэтому образовывался укороченный полипептид. Оказалось, что связь Arg^{48}–Thr^{49} в пре-S2 наиболее чувствительна к действию трипсиноподобной протеазы дрожжей. Поэтому в ген-эквиваленте белка M делетировали последовательность, кодирующую 6 аминокислотных остатков (Ser^{44}–Thr^{49}). Мутантный ген-эквивалент обозначили *M-P31c* и встроили его в экспрессирующий дрожжевой вектор под контроль промотора гена *TDH3*. Синтезируемый в дрожжах белок M-P31c не расщеплялся протеазами, более того, он гликозилировался и был способен формировать сферические частицы диаметром около 20 нм. На основе препарата таких частиц получили опытную партию вакцины и в экспериментах на шимпанзе продемонстрировали, что M-P31c является эффективным иммуногеном и обеспечивает защиту от заражения вирусом гепатита B. Очень важно, что при введении препарата M-P31c антитела против последовательности пре-S2 образуются значительно раньше (через 2 нед.), чем против белка S (1–2 мес., как и при иммунизации плазменной или рекомбинантной S-вакциной). Более того, препарат M-P31c активно индуцирует не только гуморальный, но и T-клеточный иммунный ответ против гепатита B. Все эти факты указывают на то, что данная вакцина третьего поколения против HBV более эффективна по сравнению с ранее использовавшимися (табл. 12.6).

Таблица 12.6. **Характеристика вакцин против гепатита В**

Параметр	Вакцина		
	первого поколения	второго поколения	третьего поколения
Источник	Плазма крови человека	Дрожжи	Дрожжи
Иммуноген	HBsAg-частицы	S-частицы	M-P31c-частицы
Диаметр частиц, нм	22	18	20
Составляющие белки[1]	P25, GP28	P25	GP34, GP37
Антитела против S	+++	+++	+++
Антитела против пре-S2	–	–	+++
Клеточный иммунный ответ	±	±	++

Примечание. Иммунный ответ исследовали на мышах и морских свинках: «–» обозначает отсутствие иммунитета, «±» — слабый ответ, число знаков «+» отражает уровень иммунного ответа.

[1] P25 — негликозилированный белок с молекулярной массой 25 кДа, GP28 (34, 37) — гликопротеин с молекулярной массой 28 (34, 37) кДа.

Впечатляющие успехи, достигнутые при разработке рекомбинантных субъединичных вакцин против гепатита В на системе дрожжей-сахаромицетов, активизировали исследования, направленные на создание методами генетической инженерии субъединичных вакцин против других инфекционных агентов. Например, И. Макриди с соавторами (1990 г.) создали штамм *S. cerevisiae*, эффективно продуцирующий протективный капсидный белок VP2 (41 кДа) вируса инфекционного бурсального заболевания кур. Введение рекомбинантного белка цыплятам защищало их от данного заболевания, наносящего большой урон сельскому хозяйству.

Другим важным направлением исследований является совершенствование промышленных штаммов дрожжей и создание продуцентов различных белков, необходимых для пищевой промышленности. Так, при производстве пива образуется избыток β-глюканов ячменя, что усложняет очистку пива. Поэтому на разных этапах процесса добавляют β-глюканазы, выделяемые из бактерий и грибов. Удешевить и упростить процесс пивоварения удалось после введения в промышленный штамм пивных дрожжей в составе векторной плазмиды экспрессии *S. cerevisiae* ген-эквивалента эндо-β-глюканазы из нитчатых грибов *Trichoderma reesei* (1987 г.). В качестве маркера для отбора трансформантов полиплоидного штамма пивных дрожжей использовали доминантный ген *CUP*1. В вектор YEp-типа под контроль промотора гена *PGK*1 встроили полную последовательность кДНК β-глюканазы, содержащую и ген-эквивалент сигнального пептида. Отобранные трансформанты эффективно продуцировали и секретировали в среду гликозилированную эндо-β-глюканазу, которая успешно гидролизовала β-глюканы ячменя.

Различные микроорганизмы продуцируют глюкоамилазы, гидролизующие крахмал с образованием глюкозы. Эти ферменты используют для сахарификации крахмала при производстве глюкозы и этанола. Дрожжи-сахаромицеты таких ферментов не синтезируют, поэтому было решено создать методами генетической инженерии штамм дрожжей, который был бы способен напрямую превращать крахмал в этиловый спирт. Введение гена глюкоамилазы из *Rhizopus* sp. или *Saccharomyces diastaticus* в клетки *S. cerevisiae* в составе векторной многокопийной плазмиды приводило к эффективной продукции и секреции в среду данного фермента.

Ценным ферментом для пищевой промышленности является химозин быка. Он представляет собой аспартилпротеиназу, которая расщепляет κ-казеин, вызывая свертывание молока. В этом заключается первая стадия сыроварения. В организме хозяина химозин синтезируется как пре-прохимозин длиной 381 АК. В результате секреции пре-прохимозина отщепляется сигнальный пептид (16 АК) и образуется прохимозин. Прохимозин активируется при низком pH в результате многостадийного автокаталитического отщепления 42 АК с N-конца, что приводит к образованию химозина размером 323 АК, обладающего специфичной ферментативной активностью.

Полный ген пре-прохимозина был клонирован в *E. coli* в 1982 г., определена его нуклеотидная последовательность. Это позволило выщепить части гена и, состыковав их с синтетическими сегментами, сконструировать фрагменты, содержащие кодирующие последовательности для пре-прохимозина, мет-прохимозина

и мет-химозина. (Необходимо отметить, что в природном гене инициаторный триплет ATG отсутствует перед последовательностью как прохимозина, так и химозина.) Созданные ген-эквиваленты Дж. Мелор с соавторами (1983 г.) встроили в экспрессирующий вектор pMA91. Гибридные плазмиды pMA91-66, pMA91-82 и pMA91-86 ввели в клетки дрожжей и проанализировали продукцию соответствующих белков. Иммунопреципитацией выявлена экспрессия всех трех искусственных генов, причем наибольшая продукция наблюдалась для мет-прохимозина (до 5 % суммарного растворимого белка дрожжей). Продукция препрохимозина составила примерно 1 % суммарного растворимого белка клеток, а уровень продукции мет-химозина был очень невелик (менее 0,1 % суммарного белка). Пре-прохимозин выявлялся в клетках *S. cerevisiae* исключительно в виде прохимозина, что указывает на процессинг этого белка, однако секреция прохимозина в среду в данном случае не наблюдалась. Мет-химозин, по-видимому, быстро деградируется внутриклеточными пептидазами. Синтезируемый же в клетках дрожжей мет-прохимозин значительно стабильнее. После активации он проявляет специфичную ферментативную активность. В независимом исследовании К. Гоф с соавторами (в 1984 г.) с помощью синтетического сегмента состыковали кДНК прохимозина быка с промотором гена *GAL*1 *S. cerevisiae*. Созданный гибридный ген, введенный в клетки дрожжей в составе клонирующего вектора YEp-типа, направлял синтез биологически активного бычьего фермента. Полученные штаммы позволяют упростить и удешевить процесс получения прохимозина, необходимого для пищевой промышленности.

Интересна работа Дж. Ли с соавторами (1988 г.), которые экспрессировали в *S. cerevisiae* синтетический ген-эквивалент тауматина — растительного белка, превосходящего сахарозу по сладости в 3000 раз. Продуцируемый в дрожжах белок (207 АК) правильно формировал восемь (!) дисульфидных связей и сохранял свойства тауматина. Он является перспективным заменителем сахара для ряда продуктов питания.

Возможность повышения продуктивности дрожжей по целевым эндогенным белкам показали Т. Нельсен с соавторами (1990 г.). Карбоксипептидаза Y (CPY) дрожжей является коммерческим ферментом, используемым для синтеза пептидов. Ген-эквивалент CPY встроили в плазмиду YEp-типа под контроль регулируемого сильного промотора гена *GAL*1. Созданный в результате плазмидной трансформации штамм дрожжей обеспечивал в условиях индукции *GAL*1 продукцию фермента, в 200 раз превышающую таковую в исходном штамме.

Рассмотренные примеры демонстрируют, что методы генетической инженерии позволяют создавать новые высокоэффективные технологии с использованием дрожжей-сахаромицетов, направленные на производство различных белков, имеющих важное значение для медицины, ветеринарии и производства продуктов питания. На основе богатого опыта исследований, выполненных на *S. cerevisiae*, активно разрабатываются генно-инженерные системы для других видов дрожжей и грибов, которые представляют интерес для биотехнологических процессов.

12.5.4. Двухгибридная система дрожжей для идентификации белок-белковых взаимодействий

Взаимодействия между двумя белками чаще всего выявляют *in vitro*, используя биохимические процедуры, такие как кофракционирование при хроматографии, коиммунопреципитация или химическое сшивание белков.

С. Филдс и О. Сонг в 1989 г. описали принципиально новую экспериментальную систему для выявления взаимодействия белков в эукариотической системе *in vivo*, использующую особенности организации и функционирования белка GAL4 дрожжей *S. cerevisiae*. Этот белок является активатором транскрипции генов, кодирующих ферменты метаболизма галактозы. GAL4 состоит из двух доменов: N-концевого домена, который связывается со специфическими последовательностями ДНК — UAS_G (от англ. upstream activating sequence), а также С-концевого домена, содержащего последовательности, необходимые для активации транскрипции (рис. 12.34, *а*). Данные домены называют соответственно ДНК-связывающим (GAL4-BD) и активаторным (GAL4-AD). Оказалось, что домены белка GAL4 могут выполнять свою интегральную функцию и в том случае, когда они входят в состав двух разных химерных белков, которые *in vivo* взаимодействуют между собой (см. рис. 12.34, *б*, *в*). Авторы экспериментально доказали это, сконструировав гибридные гены на основе кодирующих последовательностей GAL4 и дрожжевых белков SNF1 (серин-треонинкиназа) и SNF4 (физически ассоциирует с SNF1, усиливая его актив-

ность). Варианты синтезированных в дрожжах белков представлены на рис. 12.35.

Для плазмидной трансформации использовали штамм дрожжей *S. cerevisiae* с делецией гена *GAL4* и встройкой слитого гена *GAL1–lacZ* в локус *URA3*. Кроме того, данный штамм имел мутации по генам *HIS3* и *LEU2*, которые являлись маркерами плазмид, несущих ДНК-связывающий и активаторный домены GAL4 соответственно. В такой штамм можно было вводить гибридные плазмиды, селектировать целевые трансформанты и анализировать в них активность GAL4 по продукции β-галактозидазы. В индивидуальных клонах трансформантов в зависимости от синтезированных целевых белков активность β-Gal составляла:

GAL4(1–881)	4000
GAL4(1–147)	< 1
GAL4(1–147)–SNF1	< 1
SNF4	< 1
SNF4–GAL4(768–881)	< 1
GAL4(1–147)–SNF1 + SNF4–GAL4(768–881)	180
GAL4(1–147) + SNF4	7
GAL4(1–147) + SNF4–GAL4(768–881)	< 1
Без плазмиды	< 1

Результаты этих экспериментов подтвердили правильность предложенного метода выявления белок-белкового взаимодействия. Следует отметить, что хотя активность комплекса, состоящего из двух химерных белков (см. рис. 12.34, *в*), была значительно ниже, чем у природного белка GAL4, тем не менее этого было достаточно для окрашивания колоний соответствующих двойных трансформантов в темно-синий цвет при наличии в среде Xgal.

Дрожжевая двухгибридная система нашла широкое применение для изучения взаимодействия белков различных организмов и вирусов. Первый анализ белок-белковых взаимодействий на уровне полного генома был осуществлен группой С. Филдса в 1996 г. на примере фага Т7. Геном этого фага имеет размер 39 937 пн и кодирует 55 потенциальных ОРТ. В системе *E. coli* были получены наборы плазмид pOBD и pOAD (рис. 12.36), содержащих статистически встроенные фрагменты ДНК фага Т7, полученные в результате обработки фаговой ДНК ультразвуком (озвучивания). Гибридные плазмиды затем переносили в клетки гаплоидных штаммов дрожжей с разным типом спаривания, раздельно для каждого набора плазмид. После спаривания клеток из полученных гибридных клонов отбирали диплоидные варианты, содержащие обе плазмиды, и проверяли их на наличие активности β-галактозидазы (белок-белкового взаимодействия). Пары плазмид, для кото-

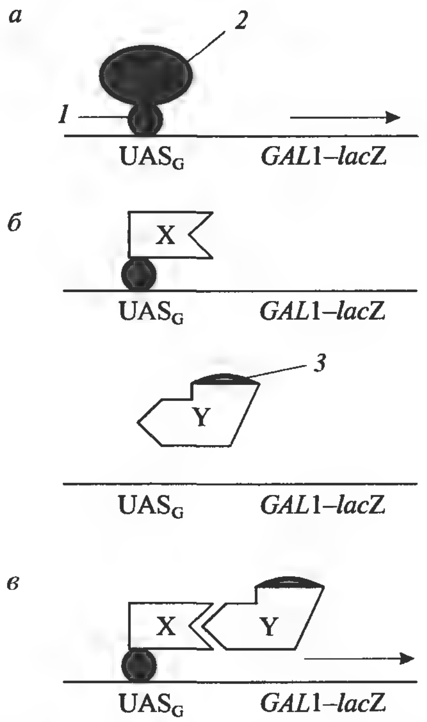


Рис. 12.34. Схема двухгибридной системы дрожжей для идентификации белок-белкового взаимодействия:

а — модель активации транскрипции с промотора гена *GAL1* дрожжевым белком GAL4; *б* — образование индивидуальных гибридов с доменами GAL4; *в* — взаимодействие гибридов с восстановлением активности GAL4; *1* — ДНК-связывающий домен GAL4 (GAL4-BD); *2* — активаторный домен GAL4 (GAL4-AD); *3* — последовательность GAL4-AD, необходимая для активации транскрипции. X, Y — любые взаимодействующие белки

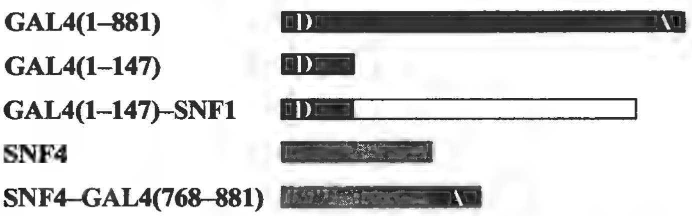


Рис. 12.35. Варианты белков, синтезированных в клетках дрожжей и использованных для разработки метода двухгибридной системы дрожжей.

D — GAL4-BD; A — последовательность GAL4-AD, необходимая для активации транскрипции

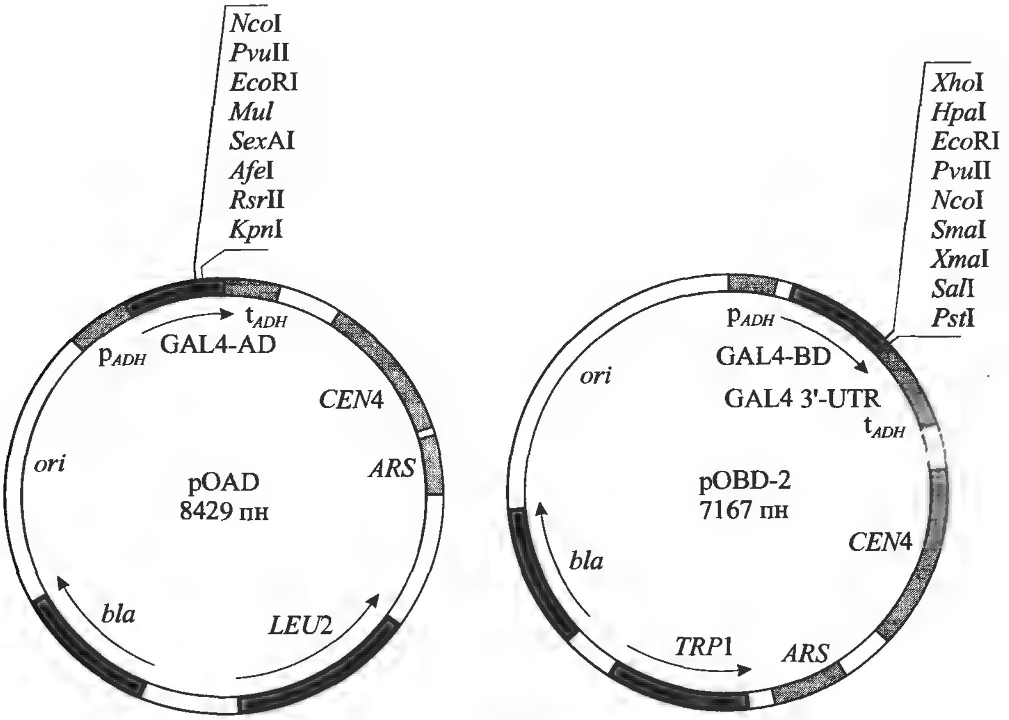


Рис. 12.36. Пример плазмид экспрессии для двухгибридной дрожжевой системы, обеспечивающих продукцию химерных белков активаторным и ДНК-связывающим доменами GAL4.

Приведены уникальные участки гидролиза рестриктазами, по которым производится встройка чужеродных последовательностей

рых обнаруживали взаимодействие слитых белков, секвенировали в районе встройки фаговой ДНК. В результате этой работы для фага T7 были выявлены 25 белок-белковых взаимодействий.

После полной расшифровки генома дрожжей *S. cerevisiae* С. Филдс с сотрудниками нескольких лабораторий в 1997 г. предприняли масштабную работу по выявлению генов дрожжей, белковые продукты которых взаимодействуют между собой *in vivo*. Чтобы охватить весь геном, необходимо было клонировать 6102 ОРТ дрожжей. Для этих целей был разработан новый методический подход (рис. 12.37). Для проведения ПЦР на каждой из потенциальных ОРТ были рассчитаны пары олигонуклеотидных праймеров.

Каждый прямой праймер содержал уникальную последовательность, специфичную к началу ОРТ, и общую для всех этих праймеров последовательность длиной 22 нуклеотида на 5′-конце. Уникальная последовательность начиналась с триплета, следующего за инициаторным ATG, и имела протяженность от 17 до 29 нуклеотидов. Длина уникальной последовательности каждого прямого праймера подбиралась так, чтобы температура плавления дуплекса этого праймера с целевой последовательностью находилась в интервале 68–72 °С.

Каждый обратный праймер содержал уникальную последовательность, специфичную к концу ОРТ, и общую для всех праймеров последовательность из 20 нуклеотидов на 5′-конце. Уникальные последовательности длиной 17–29 нуклеотидов были комплементарны последним 6–10 триплетам ОРТ, включая терминаторный.

Универсальные концы длиной по 20–22 нуклеотида, образованные в ПЦР на всех потенциальных ОРТ дрожжей (см. рис. 12.37), выполняли роль участков прайминга во второй ПЦР (реПЦР), которая позволяла провести реамплификацию полного набора ОРТ с помощью всего лишь одной пары праймеров. При этом каждый ОРТ-фрагмент удлинялся дополнительно на 50 пн универсальных последовательностей с каждого конца. Таким образом, каждая амплифицированная ОРТ была ограничена с обоих концов сегментами длиной 70 пн. Котрансформация клеток дрожжей, обработанных раствором ацетата лития и полиэтиленгликоля, определенным продуктом реПЦР и расщепленной рестриктазами *Pvu*II и *Nco*I векторной плазмидой приводила к эффективной гомологичной рекомбинации *in vivo*, что обеспечивало встройку целевой нуклеотидной последовательности в векторную плазмиду. Данный методический подход не требовал проведения дополнительных фермента-

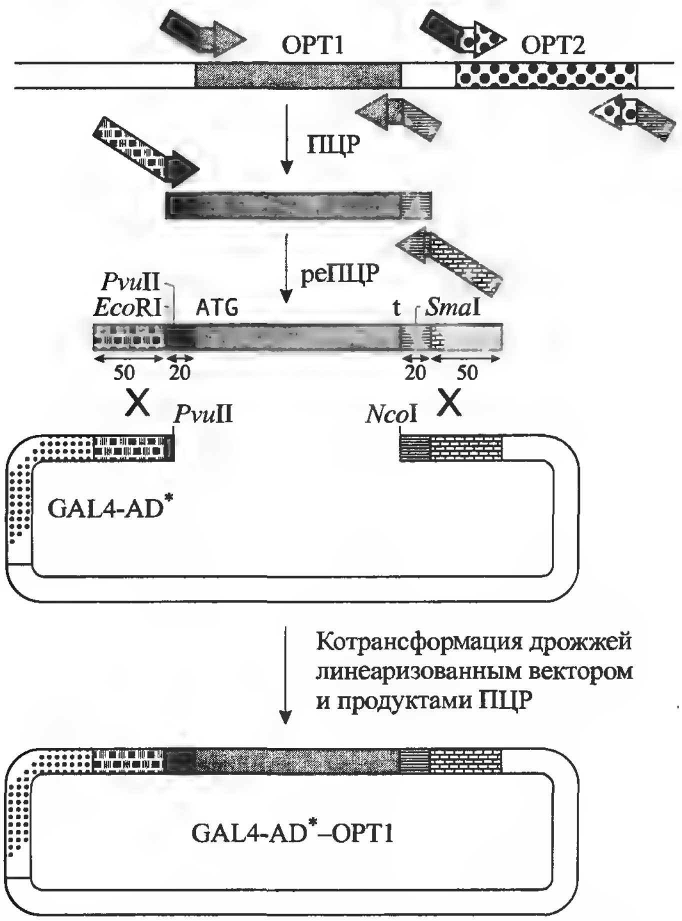


Рис. 12.37. Стратегия клонирования дрожжевых ОРТ.

GAL4-AD* — последовательность активаторного домена GAL4, необходимая для активации транскрипции

тивных реакций *in vitro* и бактерий в качестве промежуточного хозяина гибридных плазмид.

В реальном эксперименте на первом этапе ПЦР удалось успешно амплифицировать 6046 ОРТ *S. cerevisiae* (99,1 %). РеПЦР обеспечила второй этап амплификации с эффективностью около 99 %. В результате было получено около 6000 клонов *S. cerevisiae*, содержащих гибридные плазмиды, экспрессирующие химерные белки дрожжей, на N-конце которых расположен активаторный домен GAL4. Весь набор ПЦР-продуктов или трансформантов дрожжей умещался на 16 планшетах для микротитрования (по 384 лунки каждый).

Относительная простота разработанной стратегии позволила С. Филдсу с большой группой сотрудников к 2000 г. выполнить глобальный анализ белок-белковых взаимодействий для подавляющего большинства потенциальных ОРТ дрожжей. На основе гаплоидных штаммов дрожжей противоположных типов спаривания (*MATa* и *MATα*) были получены библиотеки слитых белков с активаторным и ДНК-связывающим доменами GAL4. В итоге 5345 ОРТ (87 % всех потенциальных ОРТ) *S. cerevisiae* были клонированы в обеих библиотеках. Плазмиды со встройками *GAL4-BD* в качестве селективного маркера содержали ген *TRP1*, а плазмиды с *GAL4-AD* — ген *LEU2* (см. рис. 12.37). Используя лабораторную рабочую станцию, обеспечивающую автоматизацию и компьютерный контроль операций, осуществляли многочисленные процедуры спаривания гаплоидных штаммов, содержащих гибридные плазмиды, в лунках планшетов для микротитрования. Каждый штамм одной коллекции спаривали последовательно со всеми штаммами другой коллекции. Образовавшиеся диплоидные штаммы выявляли на селективной среде без триптофана и лейцина. Эти штаммы затем анализировали на среде с Xgal на предмет индукции гена *GAL1–lacZ*. В результате такого многофакторного эксперимента были выявлены 957 взаимодействий, в которых участвовало 1004 белка *S. cerevisiae*.

Таким образом, используя разработанную двухгибридную систему, впервые удалось осуществить анализ взаимодействия белков эука-

риотического организма в масштабе полного генома. Как видим, накапливаемые данные секвенирования и роботизация многофакторных экспериментов неизмеримо увеличивают возможности экспериментальной молекулярной биологии в изучении функционирования сложных геномов как на уровне транскрипции генов, так и на уровне белок-белковых взаимодействий.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки: В 5 т. Т. 2. М.: Мир, 1986. 312 с.

Вакцины против гепатита В, приготовленные из дрожжевых клеток с помощью методов генной инженерии: Выводы и рекомендации совещания ВОЗ // Бюл. ВОЗ. 1985. Т. 63. С. 37–43.

Данилевская О. Н., Арман И. П. Молекулярная организация структурных элементов хромосом // Организация генома. М.: Наука, 1989. С. 89–109.

Захаров И. А. Хромосомы дрожжей-сахаромицетов // Там же. С. 74–88.

Картер Б. Л. А., Ирани М., Маккей В. Л. и др. Экспрессия и секреция продуктов гетерологичных генов в дрожжах // Новое в клонировании ДНК. Методы / Под ред. Д. Гловера. М.: Мир, 1989. С. 208–237.

Ларионов В. Л. Изучение механизмов репликации и сегрегации хромосом у дрожжей-сахаромицетов // Молекулярные и клеточные аспекты биотехнологии. Л.: Наука, 1986. С. 3–18.

Ростейн Р. Клонирование в дрожжах // Клонирование ДНК. Методы / Под ред. Д. Гловера. М.: Мир, 1988. С. 285–314.

Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов / И. А. Захаров, С. А. Кожин, Е. Н. Кожина, И. В. Федорова. Л.: Наука, 1984. 144 с.

Щелкунов С. Н. Клонирование генов. Новосибирск: Наука, 1986. 228 с.

Anand R., Riley J. H., Butler R. et al. A 3,5 genome equivalent multi access YAC library: Construction, characterisation, screening and storage // Nucl. Acids Res. 1990. Vol. 18. P. 1951–1956.

Armaleo D., Ye G. N., Klein T. M. et al. Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi // Curr. Genet. 1990. Vol. 17. P. 97–103.

Bachmair A., Finley D., Varshavsky A. *In vivo* half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue // Sciences. 1986. Vol. 234. P. 179–186.

Bartel P. L., Roecklein J. A., SenGupta D., Fields S. A protein linkage map of *Escherichia coli* bacteriophage T7 // Nature Genetics. 1996. Vol. 12. P. 72-77.

Bodmer M. W., Angal S., Yarranton G. T. et al. Molecular cloning of a human gastric lipase and expression of the enzyme in yeast // Biochim. Biophys. Acta. 1987. Vol. 909. P. 237–244.

Boeke J. D., Xu H., Fink G. R. A general method for the chromosomal amplification of genes in yeast // Science. 1988. Vol. 239. P. 280–282.

Broker M., Ragg H., Karges H. E. Expression of human antithrombin III in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* // Biochim. Biophys. Acta. 1987. Vol. 908. P. 203–213.

Burke D. T. Yeast artificial chromosome cloning. YAC cloning: Options and problems // Gene Anal. Techn. 1990. Vol. 7. P. 94–99.

Carbon J., Amstutz H., Clarke L. et al. Centromere structure and function in budding and fussion yeast // Eucaryotic DNA Replicat. Cold Spring Harbon (N.Y.), 1988. P. 433–439.

Chang C. N., Matteucci M., Perry L. J. et al. *Saccharomyces cerevisiae* secretes and correctly processes human interferon hybrid proteins containing yeast invertase signal peptides // Mol. Cell. Biol. 1986. Vol. 6. P. 1812–1819.

Compton J. L., Zamir A., Szalay A. A. Insertion of nonhomologous DNA into the yeast genome mediated by homologous recombination with a cotransforming plasmid // Mol. Gen. Genet. 1982. Vol. 188. P. 44–50.

Das R. C., Shultz J. L., Lehman D. J. α-Factor leader sequence-directed transport of *Escherichia coli* β-galactosidase in the secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Gen. Genet. 1989. Vol. 218. P. 240–248.

Ecker D. J., Stadel J. M., Butt T. R. et al. Increasing gene expression in yeast by fusion to ubiquitin // J. Biol. Chem. 1989. Vol. 264. P. 7715–7719.

Ernst J. F. Efficient secretion and processing of heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated solely by the pre-segment of α-factor precursor // DNA. 1988. Vol. 7. P. 355–360.

Fields S., Song O.-K. A novel genetic system to detect protein-protein interactions // Nature. 1989. Vol. 340. P. 245–246.

Fujimura H., Hishinuma F., Gunge N. Terminal segment of *Kluyveromyces lactis* linear DNA plasmid pGKL2 supports autonomous replication of hybrid plasmid in *Saccharomyces cerevisiae* // Curr. Genet. 1987. Vol. 12. P. 99–104.

Fujisawa Y., Itoh Y., Asano T. Studies on a new type of yeast-derived hepatitis B vaccine (A third generation vaccine) // J. Takeda Res. Lab. 1989. Vol. 48. P. 21–32.

Futcher B., Carbon J. Toxic effects of excess cloned centromeres // Mol. Cell. Biol. 1986. Vol. 6. P. 2213–2222.

Goodey A. R., Doel S. M., Piggott J. R. et al. The selection of promoters for the expression of heterologous genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Gen. Genet. 1986. Vol. 204. P. 505–511.

Hoekema A., Kastelein R. A., Vasser M., de Boer H. A. Codon replacement in the *PGK*1 gene *Saccharomyces cerevisiae*: Experimental approach to study the role of biased codon usage in gene expression // Mol. Cel. Biol. 1987. Vol. 7. P. 2914–2924.

Hudson J. R., Dawson E. P., Rushing K. L. et al. The complete set of predicted genes from *Saccharomyces cerevisiae* in a readily usable form // Genome Res. 1997. Vol. 7. P. 1169–1173.

Hwang Y. I., Harashima S., Oshima Y. Construction of a promoter-probe vector with the *PHO*5 gene encoding repressible acid phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1988. Vol. 28. P. 155–159.

Imai T., Olson M. V. Second-generation approach to the construction of yeast artificial-chromosome libraries // Genomics. 1990. Vol. 8. P. 297–303.

Jabbar M. A., Nayak D. P. Signal processing, glycosylation, and secterion of mutant hemagglutinins of a human influenza virus by *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Cel. Biol. 1987. Vol. 7. P. 1476–1485.

Jastreboff M. M., Ito E., Bertino J. R., Narayanan R. Use of electroporation for high-molecular-weight DNA-mediated gene transfer // Exp. Cell. Res. 1987. Vol. 171. P. 513–517.

Kamper J., Meinhardt F., Gunge N., Esser K. *In vivo* construction of linear vectors based on killer plasmids from *Kluyveromyces lactis*: Selection of a nuclear gene results in attachment of telomeres // Mol. Cell. Biol. 1989. Vol. 9. P. 3931–3937.

Leupin O., Bontron S., Strubin M. Hepatitis B virus X protein and simian virus 5V protein exhibit similar UV-DDB1 binding properties to mediate distinct activities // J. Virol. 2003. Vol. 77. P. 6274–6283.

Macreadie I. G., Vaughan P. R., Chapman A. J. et al. Passive protection against infectious bursal disease virus by viral VP2 expressed in yeast // Vaccine. 1990. Vol. 8. P. 549–552.

McCraith S., Holtzman T., Moss B., Fields S. Genome-wide analysis of vaccinia virus protein-protein interactions // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97. P. 4879-4884.

Miyajima A., Otsu K., Schreurs J. et al. Expression of murine and human granulocyte-macrophage colony-stimulating factors in *S. cerevisiae*: mutanegesis of the potential glycosylation sites // EMBO J. 1986. Vol. 5. P. 1193–1197.

Quirk A. V., Geisow M. J., Woodrow J. R. et al. Production of recombinant human serum albumin from *Saccharomyces cerevisiae* // Biotechnol. Appl. Biochem. 1989. Vol. 11. P. 273–287.

Santangelo G. M., Tornow J., McLaughlin G. S., Moldave K. Properties of promoters cloned randomly from the *Saccharomyces cerevisiae* genome // Mol. Cell. Biol. 1988. Vol. 8. P. 4217–4224.

Shaw K. J., Frommer B. R., Anagnost J. A. et al. Regulated secretion of McGM-CSF in *Saccharomyces cerevisiae* via GAL1: MFα1 prepro sequences // DNA. 1988. Vol. 7. P. 117–126.

Smith R. A., Duncan M. J., Mair D. T. Heterologous protein secterion from yeast // Science. 1985. Vol. 229. P. 1219–1224.

Szostak J. W., Blackburn E. H. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors // Cell. 1982. Vol. 29. P. 245–255.

Tokunaga M., Wada N., Hishinuma F. A novel yeast secretion vector utilising secretion signal of killer toxin encoded on the yeast linear DNA plasmid pGKL1 // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1987. Vol. 144. P. 613–619.

Uetz P., Giot L., Cagney G. et al. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae* // Nature. 2000. Vol. 403. P. 623–627.

Глава 13
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

С появлением генетической инженерии внимание многих исследователей привлекла система культивируемых клеток (культур клеток, культур тканей) млекопитающих как возможный объект для введения чужеродной генетической информации и анализа ее экспрессии. Особый интерес к культурам клеток млекопитающих стал проявляться, когда обнаружилось, что многие эукариотические гены раздроблены (экзон-интронная организация) и лишь в системе клеток высших эукариот можно достичь правильного сплайсинга (выщепления интронов) транскрибируемой пре-мРНК.

Кроме того, многие белки млекопитающих и их вирусов синтезируются первоначально в виде высокомолекулярных предшественников, которые в результате сложного специфического протелиоза переходят в зрелую форму. По-видимому, такой процессинг возможен лишь в системе определенных тканевых культур животных.

В некоторых случаях для проявления специфической биологической активности важное значение имеет гликозилирование эукариотических белков. Однако оно не может происходить в бактериальных клетках, а в клетках дрожжей не всегда соответствует природному типу. Другие способы посттрансляционной модификации белков наиболее надежно могут быть реализованы также лишь в гомологичной системе.

Активно развиваемым направлением исследований стала разработка клонирующих векторов на основе вирусов млекопитающих и использование их для создания живых поливалентных вакцин для нужд ветеринарии и медицины.

Как видим, имеются веские аргументы в пользу расширенного и углубленного изучения возможностей генно-инженерной системы культивируемых клеток млекопитающих. Уже получены впечатляющие результаты, но впереди ждут не менее интересные открытия в данной области экспериментальной биологии и биотехнологии.

13.1. ВВЕДЕНИЕ МОЛЕКУЛ ДНК В КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

13.1.1. Введение вирусных ДНК

С появлением генетической инженерии методология введения молекул ДНК в клетки млекопитающих привлекла внимание многих исследователей. К этому времени уже был разработан ряд методов трансфекции культивируемых клеток животных нуклеиновыми кислотами различных вирусов.

В многочисленных ранних экспериментах было показано, что при нанесении на культивируемые клетки млекопитающих водных растворов очищенных нуклеиновых кислот вирусов, как правило, инфекционность нуклеиновых кислот не выявляется. По-видимому, это обусловлено прежде всего неэффективным проникновением вирусных нуклеиновых кислот в клетки, а также деградацией их нуклеазами, находящимися в среде. Для увеличения эффективности трансфекции были разработаны специальные методы, способствующие проникновению нуклеиновой кислоты в клетку и защищающие ее от воздействия нуклеаз.

Гипертонический солевой метод. Впервые инфекционность очищенной вирусной ДНК на культуре клеток описали Г. ди Майорка с соавторами в 1959 г. Они показали, что, если на монослой культуры клеток животных нанести ДНК вируса полиомы в гипертоническом солевом растворе (0,5–1,0 M NaCl), образуются бляшки лизированных клеток. По-видимому, изменение осмотического давления среды приводит к активации процесса поглощения клетками вирусной

ДНК. В дальнейшем в ряде работ было показано, что эффективность трансфекции для ДНК вирусов полиомы и SV40 данным методом близка и составляет (1–3) · 10^3 БОЕ на 1 мкг ДНК. Для других типов вирусов получаемая данным методом инфекционность ДНК была заметно ниже, что стимулировало разработку новых методических подходов.

В настоящее время гипертонический солевой метод вытеснен другими, более эффективными методами трансфекции клеток млекопитающих вирусными нуклеиновыми кислотами.

ДЭАЭ-декстрановый метод. В 1968 г. Дж. Мак-Катчен и Дж. Пагано опубликовали результаты исследования, в котором показали, что поликатион диэтиламиноэтилдекстран (ДЭАЭ-декстран) значительно увеличивает эффективность трансфекции клеток животных нуклеиновой кислотой вируса SV40. Очищенную ДНК вируса SV40 инкубировали сначала в растворе с ДЭАЭ-декстраном, варьируя его концентрацию от 100 до 3000 мкг/мл. Затем эту смесь наносили на монослой клеток, который через определенный промежуток времени отмывали от поликатиона и заливали средой. В процессе последующей инкубации на монослое появлялись бляшки лизированных клеток. Эффективность трансфекции ДНК вируса SV40 таким методом составляет (1–10) · 10^6 БОЕ на 1 мкг ДНК. На эффективность трансфекции влияют молекулярная масса (наилучшие результаты достигаются при использовании поликатиона с молекулярной массой 10^6 Да) и концентрация применяемого ДЭАЭ-декстрана.

Механизм действия ДЭАЭ-декстрана окончательно не установлен, но известно, что он связывается с нуклеиновыми кислотами и частично предохраняет их от деградации нуклеазами. ДЭАЭ-декстран также взаимодействует с клеточной мембраной и, по-видимому, за счет этого увеличивает эффективную концентрацию ДНК на поверхности клеток и стимулирует пиноцитоз, хотя сам при этом клетками не захватывается.

ДЭАЭ-декстрановый метод по сравнению с гипертоническим солевым методом обеспечивает значительное увеличение инфекционности ДНК различных вирусов. Он прост и дает высоковоспроизводимые результаты. К недостаткам метода можно отнести то, что для некоторых культур клеток ДЭАЭ-декстран может быть токсичен при использовании его в высокой концентрации. Кроме того, эффективность трансфекции может существенно зависеть от качества препарата ДЭАЭ-декстрана.

Кальций-фосфатный метод. Аномально низкая инфекционность молекул ДНК аденовирусов и безуспешные попытки повысить ее, изменяя буферные растворы, концентрации ДЭАЭ-декстрана и ДНК, заставили Ф. Грэхема и А. ван дер Эба (1973 г.) искать модификации данного метода трансфекции. В 1970 г. М. Мандель и А. Хига показали, что для трансфекции бактериальных клеток *E. coli* необходимо обработать их раствором хлорида кальция (см. 2.1.3). Поэтому Ф. Грэхем и А. ван дер Эб нанесли на монослой клеток KB, предварительно обработанных ДЭАЭ-декстраном, ДНК аденовируса Ad5 в растворе $CaCl_2$. При этом эффективность трансфекции удалось повысить в 10–100 раз. В дальнейшем выяснили, что аналогичные результаты получаются, когда клетки не обрабатывают ДЭАЭ-декстраном. Поскольку в питательной среде присутствовали фосфаты, при добавлении раствора хлорида кальция образовывался осадок фосфата кальция. Удаление этого осадка из среды приводило к потере инфекционности ДНК. В результате проведенных затем экспериментов стало ясно, что трансфекция происходит в результате соосаждения вирусной ДНК и образующихся микрокристаллов фосфата кальция на клеточный монослой.

На примере ДНК вируса простого герпеса показано, что сразу после соосаждения с фосфатом кальция вирусная ДНК становится устойчивой к разрушению ультразвуком, но комплекс фосфат кальция – ДНК остается чувствительным к ДНКазе в течение 4 ч. При взаимодействии этого комплекса с культурой клеток животных ДНК становится устойчивой к ДНКазе уже в течение первого часа. Дальнейшие исследования показали, что ДНК образует с фосфатом кальция прочный комплекс, который при оптимальных условиях поглощают практически все реципиентные клетки. Эффективность поглощения клетками комплекса фосфат кальция – ДНК в значительной степени зависит от pH, при котором формировался этот комплекс, и концентрации ДНК. Важно, чтобы осадок фосфата кальция получился мелкодисперсным. Но даже в оптимальных условиях проведения трансфекции данным методом лишь в 1–5 % клеток комплекс достигает ядра. По-видимому, проникновение ДНК из цитоплазмы в ядро является критическим этапом, наиболее сильно влияющим на эффективность трансфекции клеток вирусной ДНК. Электронно-микроскопическая визуализация позволила сделать заключение, что микрокристаллы комплекса фосфат кальция – ДНК проникают в клет-

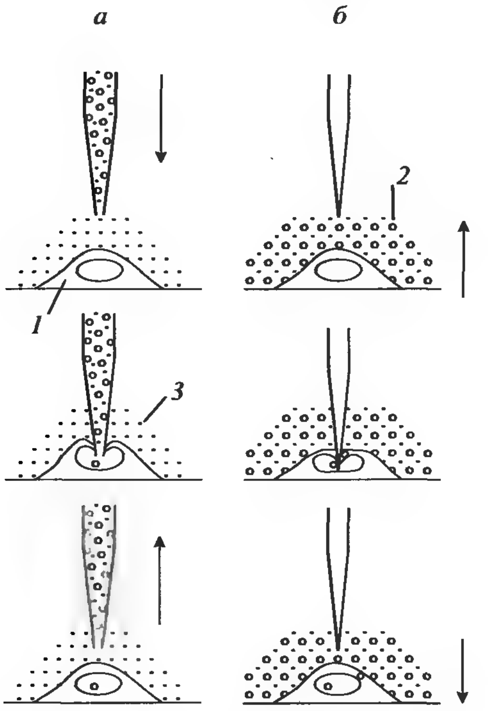


Рис. 13.1. Схема методов микроинъекций (*а*) и прокалывания (*б*), обеспечивающих введение чужеродных молекул ДНК в клетки животных:

1 — клетка; *2* молекула плазмиды; *3* – буферный раствор.

Стрелки обозначают направление движения микропипетки (*а*) или предметного столика микроскопа (*б*)

ки животных фагоцитозом и этот процесс продолжается в течение нескольких часов. Фагоцитоз данного комплекса энергетически и температурно зависим и не наблюдается в клетках с пониженным содержанием АТР или в клетках, инкубированных на холоде.

Кальций-фосфатный метод обычно более эффективен, чем ДЭАЭ-декстрановый, при трансфекции линейными вирусными ДНК и заметно уступает последнему при использовании кольцевых молекул ДНК. Вероятно, образование микрокристаллов фосфата кальция и соосаждение с ними молекул ДНК сопровождается нарушением структуры части этих макромолекул. Особенно данный эффект сказывается на лабильных кольцевых молекулах ДНК, которые после разрыва цепей и перехода в линейную форму уже не инфекционны. ДЭАЭ-декстрановый метод, как более мягкий, обеспечивает значительно бóльшую эффективность проникновения кольцевых молекул ДНК в клетки животных в неповрежденном виде, хотя в целом доля клеток, поглотивших ДНК при обработке ДЭАЭ-декстраном, существенно меньше, чем при трансфекции кальций-фосфатным методом.

Существует ряд модификаций ДЭАЭ-декстранового и кальций-фосфатного методов. Например, обнаружено, что обработка культур клеток диметилсульфоксидом (ДМСО) приводит к повышению эффективности трансфекции. Полагают, что ДМСО увеличивает проницаемость клеточных мембран, вследствие чего усиливается поглощение клетками адсорбированных молекул ДНК.

До недавнего времени при введении молекул ДНК в клетки млекопитающих наиболее часто использовали кальций-фосфатный и ДЭАЭ-декстрановый методы, так как они достаточно просты и обеспечивают высоковоспроизводимые результаты. Однако активно ведутся поиски других, более простых и эффективных методов трансфекции вирусными ДНК.

Микроинъекция вирусных молекул ДНК. А. Грессман (1970 г.) для введения молекул ДНК в культивируемые клетки млекопитающих предложил использовать метод микроинъекции. Процедура заключается во введении в клетку (цитоплазму или ядро) малых объемов жидкости (около 10^{-8} мкл) с помощью стеклянного микрокапилляра (рис. 13.1). Эксперимент проводится на предметном столике микроскопа с применением микроманипуляторов и микрошприцев. Используя эту методику, удалось изучить биологическую активность молекул ДНК разных вирусов. К достоинствам метода относится то, что определенное количество препарата ДНК можно ввести в выбранную область клетки, в частности в ядро. Недостатком метода является его сложность и невысокая производительность. Кроме того, по-видимому, он применим лишь к небольшим молекулам ДНК, так как при продавливании через микрокапилляр целостность больших молекул ДНК будет нарушаться вследствие гидродинамического сдвига. В силу отмеченных недостатков метод микроинъекции при анализе инфекционности вирусных ДНК используется крайне редко.

Липосомный метод. Синтетические фосфолипидные везикулы — липосомы — первоначально использовали для введения в клетки млекопитающих различных лекарственных веществ. После 1980 г. липосомы начали применять и для введения в культивируемые клетки животных вирусных нуклеиновых кислот. Заключенные в липосомы нуклеиновые кислоты не подвергаются воздействию нуклеаз и легко проникают в клетки за счет слияния липосом с клеточной мембраной или поглощения их путем фагоцитоза. В ряде случаев, применяя липосомы, удается достигать более высокого

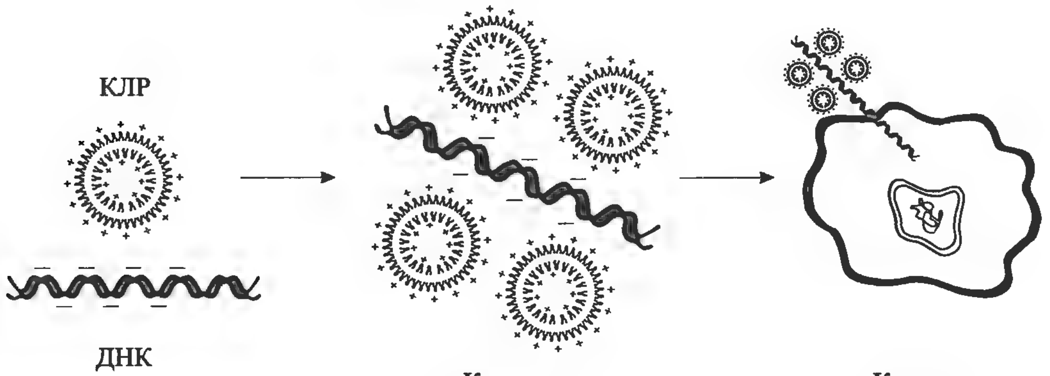


Рис. 13.2. Введение молекул ДНК в клетки млекопитающих с использованием катионного липидного реагента (КЛР)

уровня трансфекции вирусными ДНК, чем с помощью кальций-фосфатного или ДЭАЭ-декстранового методов.

Однако данный метод не очень прост в исполнении и требует подбора условий трансфекции для каждой конкретной культуры клеток. На эффективность трансфекции ДНК влияют такие параметры, как морфология липосом, состав и соотношение в них различных липидов, условия инкубации липосом с клетками (варьируя эти условия, можно получить результаты, различающиеся на три порядка). Эффективность заключения ДНК в липосомы существенно зависит от размера ее молекул. Чем крупнее вирусная ДНК, тем с меньшей вероятностью она инкапсулируется в фосфолипидные везикулы. Это связано не столько со стерическими затруднениями, сколько со способом упаковки ДНК в липосомы. Обычно используют процедуру озвучивания, приводящую к разрывам молекул ДНК, частота которых пропорциональна величине молекулы. Из-за отмеченных сложностей данный подход к трансфекции клеток вирусной ДНК не нашел широкого распространения.

Использование катионных липидных реагентов. В последние годы разработаны катионные липидные реагенты (липофектин, липофектамин, селфектин и др.), которые обеспечивают простое, быстрое и воспроизводимое введение молекул нуклеиновых кислот в культивируемые клетки млекопитающих и насекомых. Раствор ДНК просто смешивают с фирменным катионным липидным реагентом и наносят на монослой культуры клеток (рис. 13.2). При этом эффективность введения ДНК в эукариотические клетки обычно превышает таковую при использовании ДЭАЭ-декстранового или кальций-фосфатного методов.

13.1.2. Введение плазмид и фрагментов ДНК

Изучение экспрессии клонированных генов в клетках млекопитающих представляет большой интерес. Однако первоначальное клонирование фрагментов ДНК и отбор гибридных молекул наиболее просто осуществлять в бактериальных клетках. Поэтому необходимо было исследовать возможность введения бактериальных плазмид и клонированных фрагментов ДНК в культивируемые клетки животных и изучить их поддержание в таком гетерологичном окружении.

Для введения таких молекул ДНК в клетки млекопитающих прежде всего были опробованы методы, ранее разработанные для трансфекции клеток вирусными нуклеиновыми кислотами. Как и ожидалось, они оказались пригодными и в этих случаях. До недавнего времени кольцевые плазмиды и линейные фрагменты ДНК в клетки животных в основном вводили кальций-фосфатным и ДЭАЭ-декстрановым методами. Когда необходимо осуществить генетическую трансформацию, т. е. интегрировать фрагмент ДНК в геном клетки, предпочтительнее использовать кальций-фосфатный метод, так как он в этом случае обеспечивает бóльшую эффективность. Если требуется сохранить целостность вводимой кольцевой молекулы ДНК, то обычно преимущество имеет ДЭАЭ-декстрановый метод.

Одной из иллюстраций последнего положения могут быть результаты, полученные в лаборатории С. Н. Щелкунова (1980 г.). Авторы определяли эффективность введения плазмиды pBR322 в неповрежденном виде в перевиваемую культуру клеток CV-1. Культуру после адсорбции ДНК промывали, для деградации внеклеточной ДНК обрабатывали ДНКазой, выде-

ляли суммарную клеточную ДНК и трансформировали полученным препаратом компетентные клетки *E. coli*. Бактериальные клетки, трансформированные нативной плазмидой, образовывали ампициллин-устойчивые колонии. Число трансформантов определяли на весь образец ДНК (приведены результаты трех независимых экспериментов):

ДЭАЭ-декстрановый метод	Кальций-фосфатный метод
2260	70
3370	40
10 640	110

Следует отметить, что при использовании как кальций-фосфатного, так и ДЭАЭ-декстранового методов эффективность проникновения молекул ДНК в клетки животных существенно зависит от линии клеток. Кроме того, обнаружилось, что, хотя фосфат кальция успешно применяют для генетической трансформации перевиваемых культур клеток, он обычно непригоден для введения молекул ДНК в дифференцированные клетки первичных культур. Так, первичная культура клеток нормального эпителия бронхов лизируется преципитатами фосфата кальция, у других первичных культур наблюдаются ингибирование роста, нарушения клеточного цикла. В лаборатории Т. Хэриса (1987 г.) удалось преодолеть данное затруднение, используя стронций-фосфатное соосаждение экзогенной ДНК на монослой такой высокочувствительной к катионам кальция первичной культуры, какой является культура клеток нормального эпителия бронхов.

В 1980 г. М. Капекчи применил метод микроинъекции для введения плазмидной ДНК в клетки млекопитающих. При инъекции в ядра мышиных клеток L TK$^-$ плазмиды pBR322, содержащей встроенный ген тимидинкиназы вируса герпеса, в 50–100 % выросших клеточных клонов выявлялась ферментативная активность тимидинкиназы. Если данную плазмиду вводили в цитоплазму клеток, доля клонов, в которых выявлялась экспрессия гена *tk*, была значительно меньше. Это прежде всего доказывает, что ген вируса герпеса экспрессируется в ядре клетки и, кроме того, что ядерная мембрана является труднопреодолимым барьером для проникновения чужеродной ДНК в ядро клетки.

Важно отметить, что при микроинъекции плазмидной ДНК в ядра эффективность генетической трансформации клеток различных линий близка, в то время как при введении плазмид в эти клетки биохимическими методами наблюдаются существенные различия по данному параметру от линии к линии. Микроинъекция плазмидных ДНК в культивируемые клетки животных нашла довольно широкое применение.

Интересную модификацию метода микроинъекции, названную методом прокалывания, разработали Ф. Ямамото с соавторами (1981 г.). Вместо микропипетки используется микроигла. Монослой клеток заливают раствором, содержащим молекулы ДНК, которые хотят ввести в клетки. Клетки прокалывают стеклянной микроиглой, и раствор с молекулами ДНК попадает в клетки (см. рис. 13.1, *б*). Плазмиды, несущие ген тимидинкиназы вируса герпеса, при введении данным методом проникали в 25 % клеток.

В методе микроинъекции микрокапилляр подводят к каждой клетке микроманипулятором, затем прокалывают клетку и с помощью микрошприца вводят определенный объем раствора ДНК. Эта процедура трудоемка и требует относительно больших затрат времени. Метод прокалывания отличается тем, что микроигла находится в фиксированном положении, а каждая клетка подводится к ней перемещением предметного столика микроскопа. Фиксированным движением столика вверх-вниз клетка прокалывается. Данный метод по эффективности введения плазмидных молекул ДНК в клетки животных несколько уступает методу микроинъекции, но значительно превосходит его по простоте выполнения и производительности.

В ряде лабораторий для введения чужеродных молекул ДНК в клетки млекопитающих с успехом использованы липосомы. В одной из первых работ такого типа Т. Вонг с соавторами (1980 г.) заключили в липосомы фрагмент ДНК плазмиды pBR322 размером 875 пн, кодирующий β-лактамазу, и полученным препаратом обработали культивируемые клетки человека и мыши. После этого в данных культурах была выявлена экспрессия плазмидного гена.

К. Сен и К. Николау (1981 г.) показали, что доля трансформированных клеток животных при введении генетического материала в составе липосом может быть значительно повышена, если используются синхронизованные культуры, находящиеся в митозе, так как в метафазе ядерная оболочка разрушается и молекулы ДНК легко проникают в дочерние ядра, формирующиеся на последних стадиях митоза. В эксперименте до 75 % клонов клеток, образовавшихся после введения ДНК, экспрессировали чужеродные гены. Полученные результаты подтверждают, что ядерная мембрана является

труднопреодолимым барьером при переносе экзогенной ДНК в ядро клетки.

Перспективным подходом к введению плазмидных ДНК в клетки млекопитающих стал разработанный В. Шаффнером в 1980 г. метод прямого переноса плазмид из бактерий в клетки животных. Метод основан на слиянии сферопластов клеток *E. coli* с клетками животных. Для этого сферопласты осаждают на монослой клеток в искусственном поле тяжести (центрифугирование) при добавлении полиэтиленгликоля, который снижает отрицательный заряд на поверхности сферопластов и клеток и тем самым облегчает их слияние. Бактериальные клетки предварительно инкубируют с ингибитором белкового синтеза — хлорамфениколом. В этих условиях плазмиды с ослабленным контролем репликации амплифицируются и их копийность достигает нескольких тысяч на клетку. Повышенная копийность плазмиды обеспечивает высокую частоту ее проникновения в клетки животных. Другим достоинством данного метода является то, что для введения плазмид в клетки животных отпадает необходимость в наработке и очистке плазмидной ДНК.

В лаборатории Е. Неймана в 1982 г. для введения чужеродных нуклеиновых кислот в эукариотические клетки разработан метод электропорации. Показано, что обработка клеток животных электрическими импульсами с напряженностью поля 5–10 кВ/см в течение 5–10 мкс приводит к поглощению клетками молекул ДНК, находящихся в среде. При этом по частоте получения стабильных генетических трансформантов — 70–80 на 10^6 клеток на 1 мкг ДНК — электропорация сравнима с такими популярными биохимическими методами, как кальций-фосфатный и ДЭАЭ-декстрановый. Метод электропорации благодаря своей простоте привлек внимание многих исследователей и стал активно внедряться в практику. Постепенно усилиями разных лабораторий процедура электропорации была оптимизирована. Оказалось, что для большинства изученных культур клеток животных оптимальными условиями являются: напряженность прилагаемого электрического поля — 2–2,5 кВ/см; время воздействия — около 1 мс; комнатная температура; среда, содержащая физиологические концентрации солей, включая катионы Ca^{2+} и Mg^{2+}. Электропорация представляет собой относительно универсальную простую процедуру трансформации (трансфекции) клеток животных. Достоинством электропорации является также то, что с ее помощью можно вводить в клетки не только плазмиды, но и высокомолекулярную хромосомную ДНК.

В ряде лабораторий показана возможность введения чужеродных молекул ДНК в клетки млекопитающих в составе реконструированных *in vitro* вирусоподобных частиц. Так, А. Лоитер с соавторами (1983 г.) продемонстрировали эффективное введение плазмид pMB9, pBR322 и pTK-1, включенных в реконструированные оболочки вируса Сендай, в культуры клеток. Р. А. Захарян и др. (1982 г.) включили фрагмент плазмиды pBR322, содержащий ген β-лактамазы, в преформированный капсид вируса полиомы. С помощью полученных стабильных искусственных вирусоподобных частиц плазмидный ген ввели в культивируемые клетки человека и выявили в них синтез бактериального фермента.

Д. Лови с соавторами в 1980 г. обнаружили, что перенос клонированных генов в клетки животных можно осуществить соосаждением нативных частиц гибридных фагов λ с фосфатом кальция на монослой культуры клеток.

Высокоэффективного переноса фаговой ДНК в клетки млекопитающих при включении частиц гибридного фага λ в состав липосом добились Дж. Желей и Е. Дуда (1989 г.). Такие липосомы эффективно связывались с поверхностью клеток и затем фагоцитировались. В результате протяженные фрагменты чужеродной ДНК, встроенные в состав фагового генома, с высокой частотой проникали в культивируемые клетки животных. При упаковке в липосомы фаговая ДНК в составе капсида сохраняла свою целостность (в свободном состоянии такая ДНК подвергается разрывам).

М. Ботгер с соавторами (1988 г.) предложили новую процедуру введения плазмидной ДНК в культивируемые клетки млекопитающих. Оказалось, что негистоновый хромосомный белок HMG-1, выделенный из тимуса теленка, взаимодействует с плазмидной ДНК и формирует компактные ДНК-белковые частицы. Если препарат таких частиц нанести в физиологических условиях на монослой клеток, то плазмида способна проникать в клетки животных с большей эффективностью, чем при использовании кальций-фосфатного метода. Важной особенностью метода является то, что культуру клеток не подвергают нефизиологическим (физическим, химическим) воздействиям. Данный метод, по-видимому, найдет применение при ре-

шении ряда специальных задач, связанных с изучением биологии клетки.

В последние годы для введения плазмид и фрагментов ДНК в культуры клеток часто используют катионные липидные реагенты (см. 13.1.1).

Как видим, в настоящее время имеется широкий спектр методов введения молекул ДНК в культивируемые клетки млекопитающих. Это обеспечивает возможность проведения разнообразных генно-инженерных экспериментов в данной эукариотической системе.

13.2. СТАБИЛЬНОСТЬ ГИБРИДНЫХ МОЛЕКУЛ ДНК В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

При введении плазмид в клетки животных большое значение имеет их стабильность в чужеродном генетическом окружении. В одной из первых работ, посвященных этому вопросу, В. Гобел и В. Шнеб (1975 г.) показали, что введенная в клетки хомяка плазмида ColE1 постепенно гидролизуется и через двое суток в клетках находятся лишь низкомолекулярные продукты деградации меченой плазмидной ДНК.

В лаборатории С. Н. Щелкунова (1981 г.) также наблюдали постепенную деградацию плазмид pBR322 и pBS1 (сконструирована встройкой в состав pBR325 полной копии расщепленной *Eco*RI ДНК вируса SV-40), введенных в культуру клеток хомяка BHK-21 ДЭАЭ-декстрановым методом (табл. 13.1). В то же время плазмиды pBR322, pBR325 и pBS1 реплицировались в клетках мартышки линии CV-1, свободной от бактериального и микоплазменного загрязнения (табл. 13.2). Репликация плазмид была подтверждена также включением в ДНК ^{3}H-тимидина. Плазмида pBR322 выявлялась в клетках CV-1 в автономном состоянии даже после пяти пассажей культуры. В связи с этим следует отметить, что культура CV-1 в отличие от BHK-21 пермиссивна для продуктивной инфекции вирусом SV40. Полученные результаты указывают на то, что плазмиды серии pBR случайно содержат репликатороподобную последовательность, частично гомологичную *ori* ДНК вируса SV40. В плазмиде pBR322 такую функцию, по-видимому, может выполнять район 979–995 пн (вправо от *Eco*RI-участка, см. рис. 2.8).

Таблица 13.1. **Биологическая активность плазмид в клетках линии BHK-21**

Плазмида	Количество нанесенной плазмидной ДНК[1]	Время после адсорбции плазмид на клетках, сут		
		0	1	2
pBR322	8 · 10^5	588	18	12
pBS1	5 · 10^5	279	21	3

Примечание. Биологическую активность оценивали по числу ампициллин-устойчивых трансформантов *E. coli*, возникших после введения в бактериальные клетки препарата плазмиды, выделенного из клеток BHK-21.

[1] Определялось как число колоний трансформантов *E. coli*, которое образовывал данный препарат.

Таблица 13.2. **Биологическая активность плазмид в клетках линии CV-1**

Плазмида	Количество нанесенной плазмидной ДНК	Время после адсорбции плазмид на клетках, сут		
		0	2	4
pBR322	9 · 10^5	200	1300	—*
	3 · 10^6	270	6540	—
pBR325	8 · 10^5	20	2050	1730
	6 · 10^6	490	—	11860
pBS1	4 · 10^5	120	1260	1050
	1 · 10^6	250	—	2300

См. примечание к табл. 13.1.
* Не определяли.

Д. Спендидос с соавторами (1982 г.) обнаружили, что плазмида pAT153, являющаяся делеционным вариантом pBR322, у которой удалена последовательность глушителя транскрипции в клетках животных (см. 14.1.3), способна реплицироваться в разных культурах клеток, включая BHK-21. Е. Голдберг с соавторами (1981 г.) и Р. Хэрланд (1982 г.) независимо выявили репликацию pBR322 в ооцитах шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*.

Таким образом, бактериальные плазмиды иногда могут содержать последовательности, схожие по структуре с эукариотическими районами инициации репликации. Однако, как правило, эти последовательности в клетках животных функционируют относительно слабо. В ряде лабораторий показано, что значительно эффективнее плазмидные ДНК реплицируются в клетках животных в тех случаях, когда в них встроены фрагменты, содержащие области начала репликации хромосомной ДНК клеток-хозяев или репликаторы вирусов, способных продуктивно развиваться в изучаемых линиях кле-

ток. Гибридные плазмиды последнего типа активно используются в генно-инженерных экспериментах в качестве челночных векторов, которые могут реплицироваться как в клетках животных, так и в бактериях.

Гибридные ДНК в культивируемых клетках животных могут подвергаться структурным перестройкам, причем данный процесс происходит до начала репликации введенной ДНК. Учитывая это, следует при клонировании клеток, содержащих экзогенные молекулы ДНК, проводить подробный анализ структуры этих ДНК в сублиниях.

В целом современное понимание процессов проникновения экзогенных молекул ДНК в клетки животных и поддержания этих молекул в гетерологичном окружении позволяет целенаправленно конструировать гибридные ДНК, вводить их в культивируемые клетки, отбирать сублинии, стабильно сохраняющие введенную генетическую информацию, и изучать экспрессию чужеродных генов.

13.3. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Если введенная экзогенная генетическая информация способна сохраняться (в интегрированном или автономном состоянии) и экспрессироваться в клетках млекопитающих, то это может приводить к изменению не только генотипа, но и выявляемого фенотипа клеток. Данный процесс называется ***трансформацией***. Различают онкогенную (морфологическую) и генетическую (биохимическую) трансформацию клеток животных.

Наибольший интерес при введении в клетки чужеродных генов, часто называемых ***трансгенами***, представляет генетическая трансформация, поскольку она не приводит к таким значительным перестройкам метаболизма клетки, которые происходят при онкогенной трансформации. Это позволяет при использовании системы генетической трансформации получать более корректные данные о механизмах регуляции экспрессии эукариотических генов.

13.3.1. *Генетическая трансформация мутантных линий*

Возможность генетической трансформации клеток млекопитающих впервые продемонстрировал Л. Краус в 1961 г. Он выделил ДНК из костного мозга человека, гомозиготного по β^A-полипептиду гемоглобина, и обработал этим препаратом культивируемые клетки костного мозга от пациента с серповидно-клеточной анемией (β^S). В результате клетки человека приобрели способность продуцировать кроме полипептида β^S и полипептид β^A. Однако в данном случае отбор клонов трансформированных клеток был значительно затруднен, так как для рассматриваемого признака не найдены условия селекции.

Для того чтобы достаточно просто и достоверно идентифицировать клоны трансформированных клеток животных, необходимо использовать гены, кодирующие легко селектируемые признаки. Данная задача была успешно решена прежде всего в экспериментах на линиях клеток, мутантных по генам, ферментные продукты которых участвуют в биосинтезе нуклеотидов. Так, линии, дефектные по гипоксантин-фосфорибозилтрансферазе ($HPRT^-$), выделены Е. Шибальской и В. Шибальским в 1962 г. при выращивании исходной популяции клеток в присутствии 8-азагуанина. Этот аналог гуанина включается в пул пуриновых нуклеотидов (а следовательно, и в нуклеиновые кислоты) под действием HPRT, которая в норме катализирует включение в биосинтетические пути гипоксантина или гуанина (рис. 13.3). В присутствии азагуанина выживают лишь мутантные клетки, лишенные данного фермента. HPRT не является незаменимым ферментом, поскольку инозинмонофосфат может синтезироваться из низкомолекулярных субстратов — производных фолиевой кислоты (см. рис. 13.3).

Аминоптерин и метотрексат представляют собой 4-аминозамещенные аналоги фолиевой кислоты (рис. 13.4). Эти соединения блокируют дигидрофолатредуктазу, предотвращая синтез тетрагидрофолата, который участвует в синтезе инозинмонофосфата и других пуринов.

Таким образом, на среде с гипоксантином в качестве единственного источника пуринов и в присутствии ингибитора синтеза пуринов *de novo* аминоптерина будут расти клетки $HPRT^+$, а дефектные по гипоксантин-фосфорибозилтрансферазе ($HPRT^-$) — нет. Поскольку аминоптерин блокирует и синтез тимидинмонофосфата (см. рис. 13.3), в такую среду необходимо добавлять тимидин. Разработанная В. Шибальским HAT-среда (от первых букв слов hypoxanthine, aminopterin, thymidine) позволила осуществить прямой отбор клонов трансформантов с фенотипом $HPRT^+$ после обработки исходной культуры $HPRT^-$ препаратом ДНК нормальных клеток.

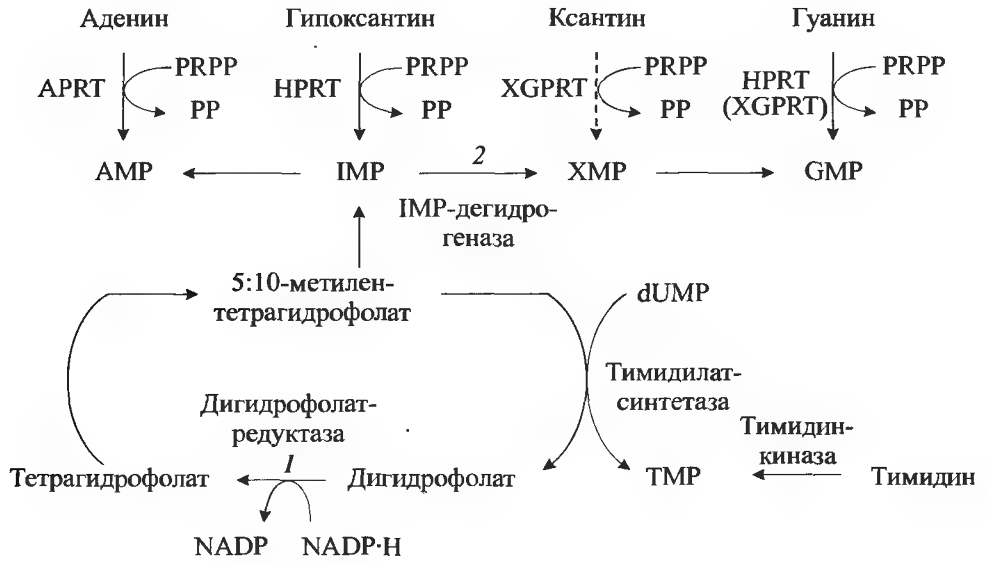
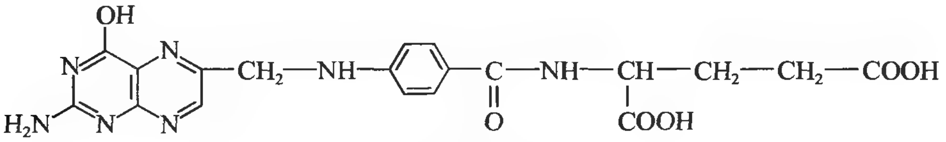
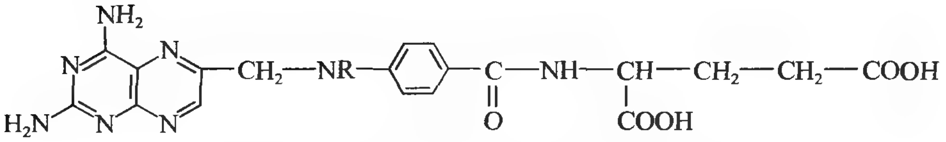


Рис. 13.3. Упрощенная схема путей биосинтеза нуклеотидов.

Ингибирование ферментов: *1* — метотрексат или аминоптерин, *2* — микофеноловая кислота. PRPP — фосфорибозилпирофосфат; APRT — аденин-фосфорибозилтрансфераза; HPRT — гипоксантин-фосфорибозилтрансфераза; XGPRT — ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза; AMP, IMP, XMP, GMP, TMP, UMP — аденозин-, инозин-, ксантин-, гуанозин-, тимидин-, уридинмонофосфат соответственно. Пунктирной стрелкой обозначен путь метаболизма, отсутствующий у млекопитающих



Фолиевая кислота



Аминоптерин (R = H) и метотрексат (R = CH_3)

Рис. 13.4. Структура фолиевой кислоты и ее аналогов

НАТ-среда также оказалась удобной для выявления клеток TK^+ с ненарушенным геном тимидинкиназы в популяции клеток TK^-. Клетки, лишенные тимидинкиназы, растут при высоких концентрациях 5-бромдезоксиуридина, который убивает клетки TK^+ в результате катализируемого тимидинкиназой включения в ДНК большого количества данного аналога. Тимидинкиназа не является незаменимым ферментом, так как клетки могут синтезировать тимидинмонофосфат из уридинмонофосфата с помощью тимидилатсинтетазы, используя фолиевую кислоту в качестве донора одноуглеродного фрагмента (см. рис. 13.3).

На ранних этапах наибольшее число исследований по генетической трансформации клеток млекопитающих выполнено на клетках TK^-. Использование гена *tk* в качестве селективного маркера было обусловлено рядом причин:

- Установлено, что вирус простого герпеса содержит ген тимидинкиназы и инфекция клеток TK^- вирусом герпеса, инактивированным ультрафиолетом, приводит к появлению клонов TK^+-трансформантов (1971 г.).
- Геном вируса значительно меньше генома клетки, поэтому относительное содержание гена тимидинкиназы в препарате вирусной ДНК намного больше, чем в клеточной ДНК. Это создало прекрасные предпосылки

для успешной трансформации клеток TK^- к фенотипу TK^+ как нативными, так и гидролизованными с помощью рестриктаз молекулами ДНК вирусов простого герпеса HSV-1 и HSV-2 (1977 г.). При этом биохимически и иммунологически подтверждено, что в получаемых TK^+-трансформантах синтезируется вирусспецифичная тимидинкиназа.

- Показано, что ген тимидинкиназы находится в *Bam*HI-фрагменте ДНК вируса HSV-1 размером 3,4 тпн (1977 г.). Клонирование этого фрагмента в составе векторной плазмиды *E. coli* pBR322 позволило нарабатывать данный вирусный ген в бактериальных клетках в больших количествах.
- Получены линии клеток, обладающих высокой компетентностью для проникновения экзогенных молекул ДНК и дефицитных по тимидинкиназе при низкой частоте спонтанной реверсии к фенотипу TK^+. Например, выделена высококомпетентная линия клеток мышиных фибробластов L TK с уровнем спонтанной реверсии $< 10^{-9}$ (1977 г.).

Анализ клонов TK^+-трансформантов показал, что вводимый вирусный ген ковалентно связывается с хромосомной ДНК клетки. Независимо выделенные клоны трансформантов различались по местам интеграции чужеродной ДНК, следовательно, встройка экзогенной последовательности не происходит только по определенной хромосоме или ее району. Многие исследователи отмечали широкую вариабельность получаемых клонов трансформантов по числу копий интегрированного гена *tk* (от одной до нескольких десятков на геном клетки). При этом в каждой клетке (клоне) встройка трансформирующей ДНК происходит в виде множественных тандемных повторов чаще всего в единственное место на одной из хромосом.

Получаемые клоны TK^+ стабильно сохраняют трансформированный фенотип в течение сотен генераций при росте клеток на селективной HAT-среде. В неселективных условиях клоны существенно различаются по стабильности сохранения фенотипа TK^+. По-видимому, большое влияние на стабильность введенного чужеродного гена оказывает генотип клетки. Так, TK^--клетки яичника китайского хомяка CHO, трансформированные геном тимидинкиназы вируса HSV-1, стабильно сохраняли фенотип TK^+ при росте в неселективных условиях.

В качестве селективного маркера М. Мэнос с соавторами в 1983 г. предложили также использовать ген тимидинкиназы вируса HSV-1 с термочувствительной мутацией *ts*1117. В результате трансформации клеток L TK^- выявляются клоны TK^+, которые при повышенной температуре не растут на HAT-среде. Такой термочувствительный маркер может быть удобен, так как позволяет легко отличить клоны ревертантов исходных TK^--клеток (нетермочувствительных) от истинных трансформантов (термочувствительных).

Д. Джолли с соавторами (1983 г.) показали, что встройка в плазмиду, содержащую ген *tk* вируса герпеса, участка длинного концевого повтора ДНК вируса саркомы мышей (содержит усилитель транскрипции; см. 14.1.1) приводит к увеличению частоты образования стабильных клонов трансформантов в 10–20 раз. При этом ориентация и расположение концевого повтора относительно *tk* не влияют на частоту трансформации.

В дальнейшем трансформацию мутантных клеток к фенотипу TK^+ удалось осуществить не только с помощью гена вируса герпеса, но и используя хромосомную ДНК различных клеток млекопитающих.

М. Уиглер с соавторами (1979 г.) продемонстрировали также возможность генетической трансформации клеток мышей $APRT^-$, дефектных по ферменту аденин-фосфорибозилтрансферазе, к фенотипу $APRT^+$ с помощью суммарной ДНК клеток дикого типа. Для клонирования таких хромосомных генов донорные фрагменты хромосомной ДНК ковалентно объединяют с ДНК плазмиды pBR322 и вводят смесь в мутантные клетки (рис. 13.5). Нуклеотидная последовательность плазмиды pBR322 выполняет в этом случае роль физического маркера. В процессе трансформации происходит интеграция в геном клетки селектируемого маркера, соединенного с pBR322. Хромосомную ДНК отобранного трансформированного клона расщепляют на крупные фрагменты, которые клонируют в составе космид или векторных фагов λ. Поиск нужных клонов гибридных космид или фагов осуществляют гибридизацией *in situ* с радиоактивно меченной ДНК плазмиды pBR322. По описанной схеме, в частности, были клонированы ген тимидинкиназы цыпленка (1979 г.) и ген *aprt* аденин-фосфорибозилтрансферазы хомяка (1980 г.).

Выполненные работы показали, что практически любой ген, по которому осуществлена генетическая трансформация клеток животных, можно выделить и клонировать в подходящем бактериальном векторе. В получаемом препарате гибридной ДНК доза данного гена намного

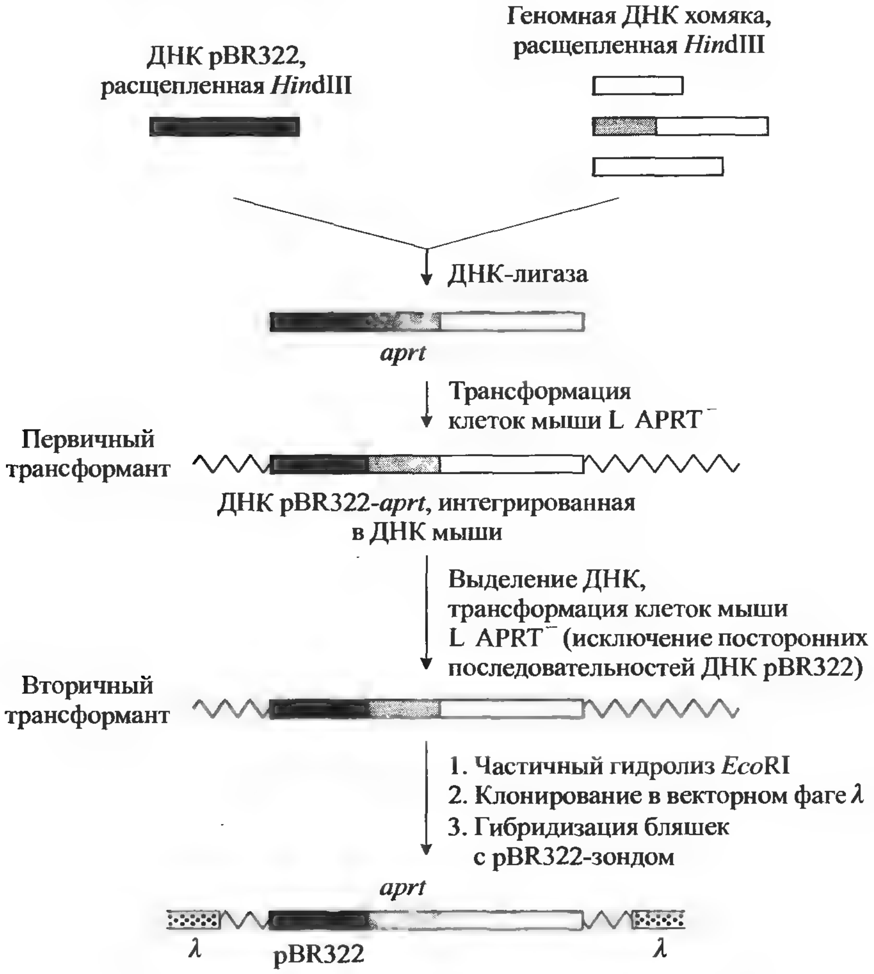


Рис. 13.5. Схема клонирования хромосомного гена *aprt* хомяка

выше, чем в препарате суммарной клеточной ДНК, что обусловливает высокую эффективность трансформации клеток клонированными генами.

В гл. 12 отмечалось, что у дрожжей плазмиды интеграции рекомбинационно встраиваются в хромосомы преимущественно по областям гомологии, т. е. за счет системы общей рекомбинации гомологичных последовательностей ДНК. Напротив, в клетках млекопитающих экзогенные молекулы ДНК интегрируются в большинстве случаев за счет негомологичной рекомбинации, а встройка по области гомологии происходит крайне редко. Предположили, что такой эффект обусловлен различиями в размере генома клеток млекопитающих и дрожжей-сахаромицетов. У первых геном примерно в 200 раз больше, т. е. относительное содержание уникального локуса во столько же раз меньше. Для проверки этой гипотезы Х. Женг и Дж. Уилсон (1990 г.) использовали две культуры клеток — с единичным и амплифицированным до 800 копий генами дигидрофолатредуктазы — и плазмиду интеграции, у которой в состав гена *dhfr* был встроен селективный маркер. Оказалось, что столь радикальное увеличение представленности в геноме области гомологии с плазмидой интеграции не повлияло на частоту встройки этой плазмиды за счет системы общей рекомбинации. Таким образом, по-видимому, имеются существенные различия механизма интеграционной генетической трансформации клеток млекопитающих и дрожжей *S. cerevisiae*.

13.3.2. Котрансформация

В независимых экспериментах доказано, что если в составе одной гибридной плазмиды объединить ген тимидинкиназы и неселектируемую последовательность, то в отобранных TK^+-клонах в геноме клетки наряду с селектируемым маркером будет находиться в интегрированном состоянии и ковалентно связанный с ним в плазмиде ген. Одновременно ряд авторов обнаружили, что при введении в клетки животных совместно с геном тимидинкиназы любых других ковалентно не связанных молекул ДНК в трансформантах TK^+ данные последовательности выявляются с большой частотой. Это

обусловлено тем, что в популяции клеток имеется лишь незначительная субпопуляция компетентных клеток, которые в силу своего физиологического состояния с большей частотой, чем другие клетки, поглощают вводимую биохимическим методом экзогенную ДНК независимо от ее природы. Если клетки обрабатывать смесью двух препаратов ДНК, то в высококомпетентные клетки с большой вероятностью попадают молекулы ДНК обоих типов. Проникшая чужеродная генетическая информация интегрируется в геном клетки. По аналогии с совместной трансформацией бактериальных клеток плазмидными ДНК обнаруженное явление было названо ***котрансформацией***.

В первых экспериментах (1979 г.) по котрансформации клеток млекопитающих в качестве селектируемого маркера использовали ген тимидинкиназы вируса простого герпеса. Котрансформируемыми были молекулы ДНК фага ϕX174, плазмиды pBR322, генов β-глобина кролика и β-глобина человека. После обработки клеток TK^- смесью ДНК отбирали клоны TK^+-трансформантов и гибридизацией выявляли в них неселектируемую котрансформируемую ДНК. Было обнаружено, что при молярном соотношении гена *tk* и котрансформируемой ДНК в интервале от 1 : 2 до 1 : 20 примерно 30 % клонов TK^+ содержали совместно вводимую ДНК, а при увеличении этого соотношения до 1 : 2000 — не менее 80 %. При этом выяснилось, что котрансформируемые автономные молекулы ДНК, полученные из разных источников, интегрируются в геном клетки в виде множественных повторов и в процессе интеграции в хромосомную ДНК оказываются тесно сцепленными. Возможно, это обусловлено образованием конкатемерных форм экзогенной ДНК в результате межмолекулярного лигирования (рекомбинации) *in vivo*.

При анализе клонов TK^-, выросших после котрансформации клеток L TK^-, не удалось выявить последовательности вводимой в большом избытке неселектируемой ДНК. Это еще раз свидетельствует о наличии субпопуляции компетентных клеток в используемой культуре.

Показано, что можно выделить клоны котрансформантов, стабильно сохраняющих при множественных пересевах введенную чужеродную ДНК, для которой нет условий селективного давления. Таким образом, существует реальная возможность отбирать стабильные клоны котрансформантов, содержащие любой желаемый ген.

13.3.3. Доминантные амплифицируемые маркеры генетической трансформации

Рецессивные маркеры типа генов *tk* и *aprt* удается использовать лишь для трансформации линий клеток, мутантных по этим генам, что существенно уменьшает число культур, которые можно подвергнуть изучению. При использовании доминантных маркеров такого ограничения уже быть не должно и трансформацию можно проводить практически на любой культуре клеток. Первым использованным маркером доминантного типа явился ген дигидрофолатредуктазы *dhfr*. Культивируемые клетки животных чувствительны к очень небольшим концентрациям ингибитора дигидрофолатредуктазы — метотрексату (Mtx). На среде с метотрексатом удается выделять Mtx-устойчивые линии клеток. При этом устойчивость к данному ингибитору может быть обусловлена тремя причинами: сниженным проникновением его в клетки; продукцией необычно большого количества дигидрофолатредуктазы; наличием в клетках мутантной формы фермента DHFR, у которого значительно снижена аффинность к метотрексату.

Исследования показали, что чаще всего повышенный уровень синтеза дигидрофолатредуктазы обусловлен амплификацией гена *dhfr*. Также был выделен вариант линии клеток хомяка A29, у которых наблюдалась увеличенная продукция мутантной формы DHFR со сниженной аффинностью к Mtx. Хромосомную ДНК этих клеток использовали М. Уиглер с соавторами (1980 г.) для трансформации Mtx-чувствительных клеток мыши L TK^- $APRT^-$ к фенотипу Mtx^r. Авторы доказали, что чужеродный ген *dhfr* интегрируется в геном клеток мыши и обусловливает устойчивость этих клеток к метотрексату. Отбор трансформантов проводили при низком содержании Mtx в среде (0,1 мкг/мл). Пересев селектированных клонов клеток на средах с последовательно возрастающими концентрациями данного антибиотика (до 40 мкг/мл) позволил получить высокоустойчивые линии клеток, в которых выявлена амплификация чужеродного гена дигидрофолатредуктазы. Более того, оказалось, что котрансформируемая ДНК плазмиды pBR322 выявляется в хромосомной ДНК Mtx^r-клонов и при селекции на среде с повышенной концентрацией антибиотика амплифицируется совместно с геном *dhfr*.

Использование гена дигидрофолатредуктазы, обусловливающего доминантную устойчивость к метотрексату, в качестве маркера гене-

тической трансформации позволяет значительно расширить круг культур клеток, на которых можно осуществлять котрансформацию генов. Способность гена *dhfr* и прилегающих к нему последовательностей амплифицироваться в селективных условиях дает возможность совместно с геном *dhfr* амплифицировать любой чужеродный ген (***коамплификация***). Для увеличения эффективности и упрощения процедуры трансформации клеток животных селектируемый ген необходимо иметь в составе гибридной ДНК, легко размножаемой в бактериальных клетках. Поэтому в ряде лабораторий были предприняты попытки создать гибридные плазмиды, несущие ген *dhfr*.

Размер гена *dhfr* составляет примерно 32 тпн, хотя для кодирования белка необходимо лишь 558 пн. Данный ген имеет раздробленную структуру и состоит из шести экзонов, разделенных протяженными интронами. Конструирование интегративного вектора на основе такого крупного фрагмента ДНК малоперспективно. Поэтому усилия исследователей были направлены на клонирование кДНК дигидрофолатредуктазы или кодирующей последовательности аналогичного бактериального гена.

Так, под контроль раннего промотора вируса SV40 в составе векторной плазмиды pKCR (см. рис. 14.9) была встроена кодирующая последовательность гена дигидрофолатредуктазы *E. coli*. Полученная плазмида pHG обеспечивала трансформацию фибробластов мыши к фенотипу Mtx^r. При этом происходила интеграция множественных копий pHG в геном клеток. Транскрипция прокариотической последовательности инициировалась с раннего промотора SV40, гибридная мРНК подвергалась правильному сплайсингу и полиаденилированию на сигналах 3′-концевой части РНК β-глобина кролика.

В другой работе промоторную область длинного концевого повтора ДНК вируса саркомы Харвея состыковали с последовательностью кДНК дигидрофолатредуктазы мыши. Сконструированный гибридный ген в составе pBR322 ввели в клетки мыши и продемонстрировали возможность трансформации клеток к фенотипу Mtx^r. Гибридный ген направлял эффективный синтез дигидрофолатредуктазы и амплифицировался при росте клеток на среде с повышенной концентрацией метотрексата. Созданные плазмиды удобно использовать как интегративные векторы, с помощью которых можно вводить в геном клеток млекопитающих чужеродные гены и эффективно их амплифицировать.

В настоящее время ясно, что способность амплифицироваться, по-видимому, не ограничена одним или несколькими локусами в геноме эукариотической клетки. Амплификация того или иного гена является случайным и довольно редким событием, которое можно обнаружить при определенном селективном давлении. Размер амплифицируемой последовательности может существенно различаться даже в клонах одной линии клеток и варьирует от нескольких сотен до 10 000 тпн, что значительно превышает размер селектируемого гена. Это указывает на то, что прилегающие к селективному гену последовательности также вовлекаются в амплификацию.

Известно два варианта существования в клетке амплифицируемой последовательности (иногда возможны и «смешанные» состояния):

- Амплифицированная последовательность в основном выявляется в виде множественных кольцевых внехромосомных мелких образований — DM-хромосом (от англ. double minute). DM-элементы не имеют центромеры, поэтому распределяются в митозе случайным образом, что обусловливает нестабильность признака устойчивости к использованному для амплификации соединению.
- Множественные копии амплифицированной последовательности локализованы в одной или реже в нескольких хромосомах. Амплифицированная область хромосомы может содержать до нескольких сотен последовательностей изучаемого гена. При этом наряду с прямыми повторами могут быть и инвертированные, а также иногда наблюдаются перестройки в амплифицируемых последовательностях.

Эффективность амплификации интегрированного в геном клетки гена и стабильность хромосом, содержащих амплифицированный ген, существенно зависят от места интеграции трансформирующего гена (эффект положения гена). Обнаружено, что в амплифицируемом сегменте ДНК находится участок инициации репликации (*ori*) хромосомной ДНК. Это позволяет из ДНК линий клеток с высокой степенью амплификации изучаемого сегмента достаточно просто выделять рестрикционный фрагмент, содержащий данный хромосомный *ori*, и клонировать его.

Наблюдаемые различия в структурной организации и локализации амплифицированных последовательностей привели к предположе-

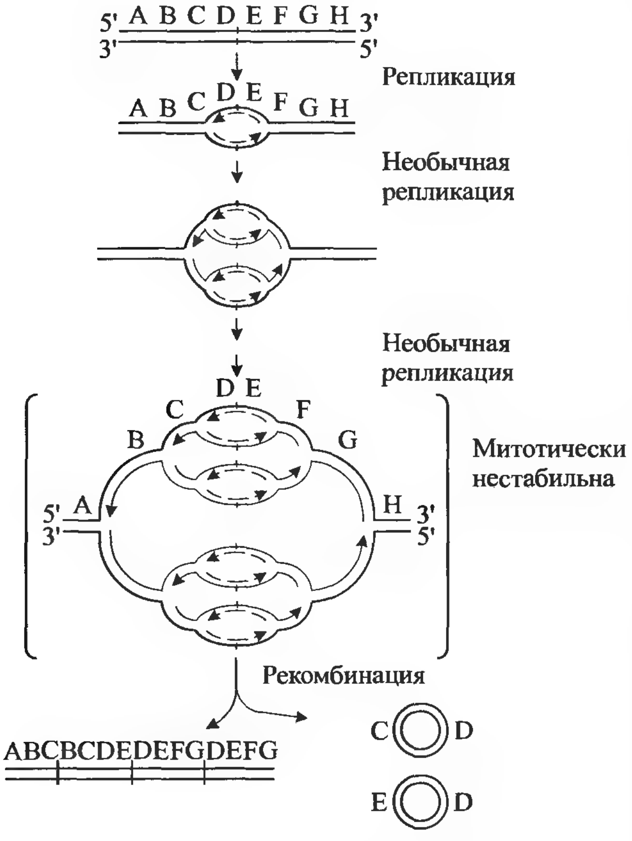


Рис. 13.6. Модель амплификации ДНК млекопитающих

нию, что в различных ситуациях действуют разные механизмы амплификации сегментов ДНК.

Первую модель, объясняющую многие экспериментальные данные, предложили Г. Старк и Г. Вол в 1984 г. (рис. 13.6). По их мнению, амплификация определенного участка хромосомы может быть обусловлена необычной множественной инициацией репликации ДНК в этом участке во время S-фазы клеточного цикла. При этом формируется структура типа «луковой кожуры» (onionskin structure). Последующие рекомбинационные события могут приводить к появлению или внехромосомных DM-элементов, или множественных повторов в хромосоме.

Другие исследователи не исключали возможности того, что внехромосомное состояние амплифицируемого участка является промежуточным при формировании множественных повторов в хромосомной ДНК. Основываясь на модели Б. Фючера репликации ДНК дрожжевой плазмиды Scp1 (см. рис. 12.5), К. Пэсененти с соавторами (1987 г.) предложили модель амплификации хромосомной ДНК через образование внехромосомных кольцевых промежуточных форм (рис. 13.7). Достоинство этой модели в том, что она не предполагает локального нарушения контроля репликации хромосомной ДНК в районе амплификации. В процессе репликации из хромосомы выщепляется кольцевая ДНК, состоящая из двух протяженных инвертированных повторов. Эта кольцевая ДНК содержит *ori*, и на нем инициируется двунаправленная репликация. За счет общей внутримолекулярной рекомбинации возможна инверсия одной из вилок репликации, после чего обе вилки репликации движутся в одном направлении. Это приводит к многократной амплификации выщепленного сегмента ДНК. Амплифицированная таким образом последовательность за-

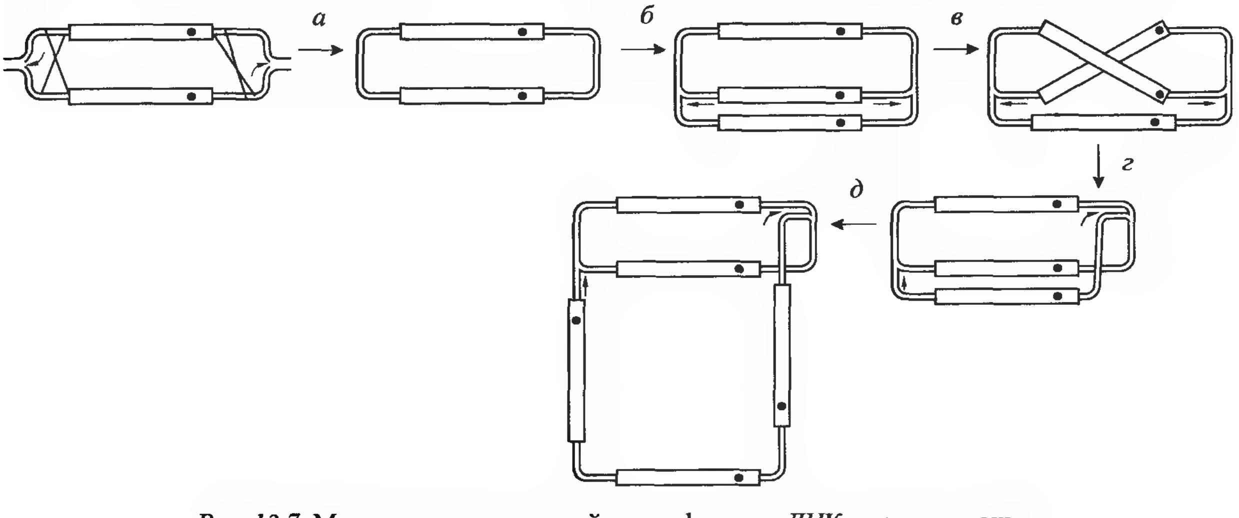


Рис. 13.7. Модель внехромосомной амплификации ДНК млекопитающих:

а — исключение из реплицирующегося района хромосомы кольцевой ДНК, состоящей из двух инвертированных повторов; *б* — репликация кольцевой ДНК;
в — рекомбинация между реплицирующейся и нереплицирующейся частями инвертированных повторов;
г — образование молекулы ДНК с двумя репликационными вилками, движущимися в одном направлении;
д — репликация, приводящая к амплификации выщепленной последовательности

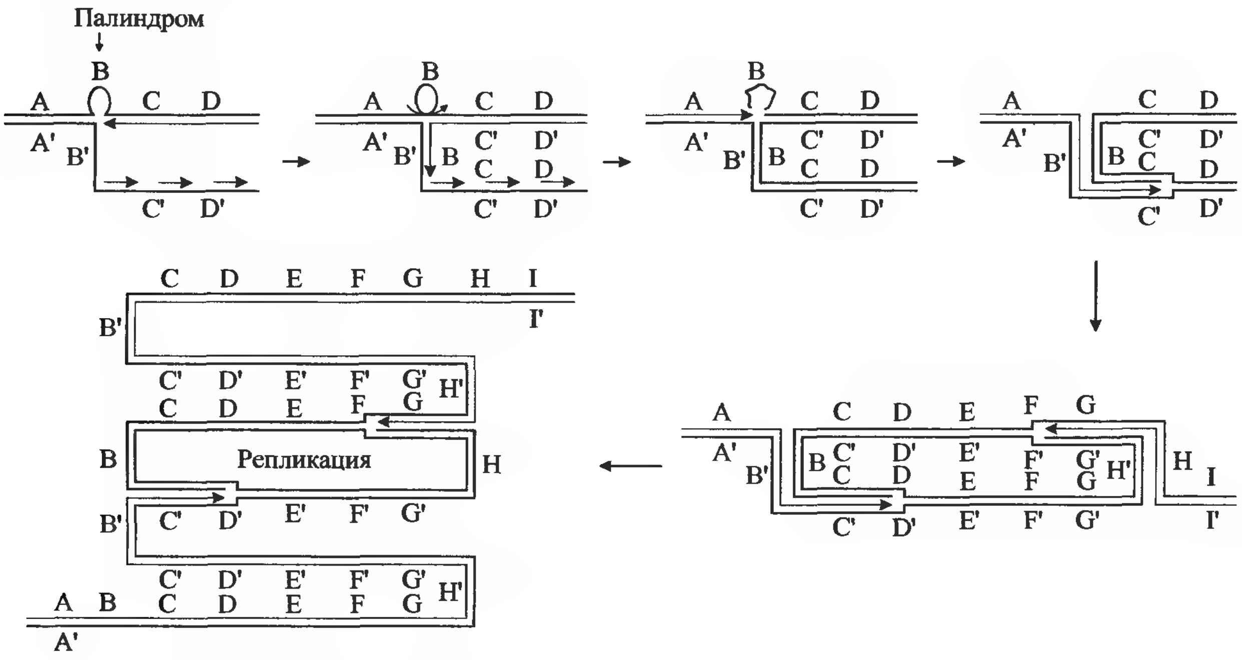


Рис. 13.8. Модель внутрихромосомной амплификации ДНК млекопитающих

тем может быть интегрирована в хромосомную ДНК.

В 1988 г. О. Хирен с соавторами предложили другую модель амплификации сегмента ДНК без выщепления его из состава хромосомы (рис. 13.8). Важное значение для этой модели имеют палиндромные последовательности, которые обусловливают «поворот» полимеразного комплекса, в результате чего образуются две вилки репликации, движущиеся друг за другом.

Предложенные модели, по-видимому, отражают многообразие механизмов амплификации хромосомной эукариотической ДНК и разнообразие формирующихся при этом продуктов.

Г. Старк с соавторами (1982 г.) разработали метод отбора гибридных молекул ДНК, содержащих амплифицированные локусы. Метод основан на том, что в денатурированной высокомолекулярной ДНК скорость реассоциации какой-либо нуклеотидной последовательности пропорциональна ее повторяемости в изучаемой ДНК. Определенная последовательность, амплифицированная в геноме клетки, будет реассоциироваться в цикле денатурации–ренатурации ДНК с большей скоростью, чем если бы она находилась в геномной ДНК в единственном экземпляре. Выбрав условия ренатурации и выделив на гидроксилапатите фракцию двухцепочечной ДНК, можно существенно обогатить препарат ДНК повторяющимися последовательностями. Если таким методом обрабатывать препараты хромосомной ДНК клеток дикого типа и клеток с амплифицированным геном, то полученные после ренатурации обогащенные повторяющимися последовательностями образцы ДНК будут различаться лишь тем, что во фракции ДНК мутантных клеток будет присутствовать последовательность амплифицированного гена, а в ДНК клеток дикого типа — нет. Выделенные фракции ДНК радиоактивно метят с помощью ник-трансляции и используют как зонды в экспериментах по гибридизации нуклеиновых кислот *in situ* при анализе библиотеки генов мутантной линии клеток.

Библиотека генов представляет собой большое количество клонов гибридных фагов λ или космид (см. 2.2.2, 2.2.3). Негативные колонии гибридных фагов или колонии клеток *E. coli*, содержащих гибридные космиды, перепечатывают на нитроцеллюлозные фильтры и осуществляют гибридизацию нуклеиновых кислот *in situ* с каждым из полученных меченых препаратов ДНК. Те клоны, в которых обнаруживается гибридизация с ДНК-зондом мутантных клеток и отсутствует гибридизация с ДНК-зондом клеток дикого типа, содержат амплифицированную последовательность.

С помощью разработанного метода был клонирован ген, кодирующий многофункциональный белок CAD. Данный белок содержит три ковалентно связанные ферментативные активности: карбамилфосфатсинтетазу, аспартат-транскарбамилазу и дигидрооротазу. N-(фосфонацетил)-*L*-аспартат (PALA) является высокоспецифичным ингибитором аспартат-транскарбамилазы, и мутантные клетки, устой-

чивые к действию PALA, содержат амплифицированную последовательность гена белка CAD. Показано, что данный ген, как и ген *dhfr*, можно использовать в качестве доминантного селективного маркера для биохимической трансформации клеток животных и коамплификации других генов.

Методология генетической трансформации клеток млекопитающих позволяет осуществлять интеграцию чужеродных генов в геном различных типов культивируемых клеток и в разные хромосомы клеток одной линии. Это оказывает неоценимую услугу при изучении *цис-* и *транс*-зависимой регуляции функционирования генов, дает возможность исследовать влияние тканеспецифических факторов на экспрессию генов, процессинг мРНК и белков и др. В конечном счете все это способствует более глубокому пониманию основных закономерностей организации генетической информации у высших эукариот.

Вводя в геном клетки млекопитающих чужеродные гены и амплифицируя их, можно получать линии клеток, стабильно продуцирующих большие количества целевого белка. Например, Дж. Кристмен с соавторами (1982 г.) в результате котрансформации и коамплификации с геном *dhfr* получили линии клеток мыши, продуцирующих и экскретирующих в среду большие количества гликозилированного полипептида поверхностного антигена вируса гепатита В, образующего иммуногенные частицы диаметром 22 нм. Полученные сублинии, стабильно сохраняющие свои свойства, можно уже рассматривать как продуценты субъединичной вакцины против вируса гепатита В.

Продуктивность коамплификации целевого гена, интегрированного в геном культивируемых клеток, продемонстрировали Ф. Мак-Кормик с соавторами (1984 г.). Они сконструировали плазмиды pM17 и pGC10 (рис. 13.9), содержащие функционирующий гибридный ген *dhfr* и хромосомный ген фибробластного интерферона человека (IFN-β). Причем pM17 несла природный ген интерферона, а в pGC10 кодирующая последовательность IFN-β была состыкована с промотором p_E вируса SV40. После трансформации клеток хомяка CHO.DHFR$^-$ данными гибридными плазмидами отбирали DHFR$^+$-трансформанты (обозначены CHO.M17 и CHO.GC10) и анализировали в них уровень продукции интерферона человека без использования индукторов, а также после индукции интерферона вирусом болезни Ньюкасла или препаратом двухцепочечной поли(I)·поли(C). Ока-

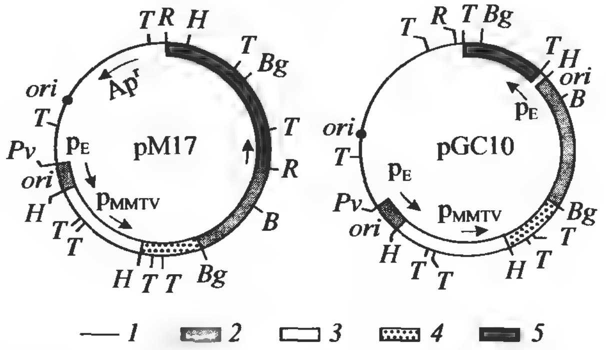


Рис. 13.9. Плазмиды, используемые для экспрессии гена фибробластного интерферона человека в культуре клеток CHO:

1 — последовательность ДНК pBR322, *2* — SV40; *3* — промоторная область длинного концевого повтора ДНК вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV); *4* — кодирующая последовательиость гена дигидрофолатредуктазы мыши; *5* — ген IFN-β. *R* — сайт рестрикции *Eco*RI, *H* — *Hin*dIII, *B* — *Bam*HI, *Bg* — *Bgl*II, *Pv* — *Pvu*II, *T* — *Taq*I

залось, что в отобранных линиях клеток CHO, содержащих плазмиды pGC10 или pM17, человеческий IFN-β конститутивно секретировался из клеток. Кроме того, в последнем случае продукция интерферона была индуцируемой (табл. 13.3). Это обусловлено тем, что в pM17 находится нативный ген интерферона со всеми прилегающими к кодирующей последовательности регуляторными элементами.

Первоначально отобранные Mtx^r клетки CHO.M17, содержащие pM17, селектировали на средах с повышающимися концентрациями метотрексата. Полученные производные линии CHO.M17, устойчивые к 10, 30 и 1000 нМ метотрексата (обозначенные CHO.M17.R10, CHO.M17.R30 и CHO.M17.R1000 соответственно), конститутивно синтезировали повышенные количества интерферона, а после индукции поли(I)·поли(C) линия CHO.M17.R1000 продуцировала до 1 е. а. IFN на 1 клетку в сутки, что

Таблица 13.3. **Продукция фибробластного интерферона человека в клетках CHO, е. а./(10^6 клеток · сут)**

Линия клеток	Без индукции	С индукцией	
		вирусом болезни Ньюкасла	поли(I) · поли(C)
CHO.DHFR$^-$	0	0	0
CHO.GC10	30	30	30
CHO.M17	15	3000	19 000
CHO.M17.R10	160	1000	35 000
CHO.M17.R30	2000	100 000	475 000
CHO.M17.R1000	5000	—	1 000 000

соответствует 10^{10} е. а. IFN на 1 л среды. Такой эффективной продукции фибробластного интерферона не удавалось получить ни в бактериальных, ни в дрожжевых штаммах-продуцентах. Необходимо отметить, что подавляющая часть β-интерферона человека, синтезируемого в клетках хомяка, гликозилировалась и секретировалась в среду.

Рассмотренный экспериментальный подход позволил создать множество линий клеток млекопитающих, которые эффективно продуцировали полноценные белки человека и животных. Такие белки крайне необходимы для медицины и ветеринарии, но в ряде случаев не могут быть получены в клетках бактерий или дрожжей.

13.3.4. Эписомные векторы генетической трансформации

Для введения чужеродных генов в клетки млекопитающих несомненный интерес представляют векторы, объединяющие в себе свойства эписомных векторов паповавирусов (см. 14.1.3) и векторов генетической трансформации клеток по маркерам доминантного типа. Такие векторы способны реплицироваться в клетках, пермиссивных для литического развития соответствующего вируса, а наличие биохимического селективного маркера позволяет в простой системе отбирать клоны клеток, содержащих гибридные ДНК, чего нельзя осуществить для обычных эписомных векторов.

Первым геном, использованным для конструирования векторов рассматриваемого типа, явился ген *gpt* ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (XGPRT) *E. coli*, для которого сначала удалось показать экспрессию в составе литического вектора SVGT5 вируса SV40 (см. 14.1.2). Данный ген Р. Маллигэн и П. Берг (1981 г.) встроили в плазмиду pSV2 (см. рис. 14.9) и гибридную молекулу обозначили pSV2-*gpt*.

Рассмотрим принцип селекции $XGPRT^+$-клонов клеток млекопитающих. При синтезе пуриновых нуклеотидов *de novo* инозинмонофосфат (IMP), являющийся первым промежуточным нуклеотидом, превращается в аденозинмонофосфат (AMP) через аденилсукцинат и в гуанозинмонофосфат (GMP) — через ксантинмонофосфат (XMP). При синтезе нуклеотидов из готовых фрагментов происходит конденсация пуринов с фосфорибозилпирофосфатом (см. рис. 13.3). Пути синтеза нуклеотидов *de novo* почти одинаковы во всех нормальных клетках, однако пути синтеза из готовых фрагментов значительно различаются. Так, в клетках млекопитающих имеется фермент гипоксантин-фосфорибозилтрансфераза, который переводит гипоксантин и гуанин в IMP и GMP соответственно. Но при этом в клетках млекопитающих нет фермента, соответствующего бактериальной ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазе, которая превращает ксантин в XMP.

Микофеноловая кислота, являющаяся ингибитором IMP-дегидрогеназы, предотвращает образование в клетках млекопитающих XMP, а следовательно, и GMP. Блокировать альтернативный путь синтеза пуриновых нуклеотидов можно также с помощью аминоптерина или метотрексата, которые подавляют синтез IMP *de novo* (см. рис. 13.3). Ингибирующий эффект этих соединений можно преодолеть, добавляя в среду гуанин, а также гипоксантин или аденин. На среде, содержащей микофеноловую кислоту и аминоптерин, а также ксантин с аденином в качестве единственных предшественников пуриновых нуклеотидов, нормальные клетки животных расти не будут, так как они не способны переводить ксантин в XMP. В таких условиях будет наблюдаться рост только тех клеток, в которых синтезируется бактериальный фермент XGPRT.

Эксперименты показали, что плазмида pSV2-*gpt*, введенная в различные культуры клеток млекопитающих, эффективно направляет синтез бактериального фермента. Ген *gpt E. coli* представляет собой маркер доминантного типа, так как позволяет отбирать клоны трансформантов из популяции клеток млекопитающих с любым генотипом. Экспрессия данного гена в созданной плазмиде контролируется сигналами ранних генов вируса SV40. Важным свойством плазмиды pSV2 и ее производных является то, что они эффективно реплицируются в автономном состоянии в культивируемых клетках линии COS (см. 14.1.2). В других линиях клеток производные pSV2 интегрируются в геном. При необходимости интегрированные в составе pSV2 гены могут быть легко исключены из хромосомной ДНК и амплифицированы в результате слияния трансформированных клеток с комплементирующими клетками типа COS. После такого слияния гибридная pSV2 под действием Т-антигена, синтезируемого в COS-клетках, переходит во внехромосомное состояние и активно реплицируется. Как видим, плазмиды серии pSV2 являются типичными эписомными векторами.

По отработанной схеме были сконструированы плазмиды серии pSV2, содержащие другие доминантные селективные маркеры. Напри-

мер, гибридная плазмида pSV2-*dhfr*, несущая кДНК гена *dhfr* мыши, обеспечивает эффективный прямой отбор метотрексат-устойчивых клонов клеток.

Кроме того, использован ген *neo* транспозона Tn*5*, кодирующий аминогликозидфосфотрансферазу (неомицин-фосфотрансферазу), которая деградирует антибиотик широкого спектра действия G-418 (2-дезоксистрептамин). Клетки млекопитающих чувствительны к данному антибиотику, поэтому при введении в них гибридных плазмид серии pSV-*neo* на среде с G-418 удается отбирать клоны устойчивых трансформантов. Плазмидная ДНК интегрируется в геном клеток в виде множественных повторов и стабильно сохраняется при росте клонов трансформантов в неселективных условиях.

Плазмида pSV2-*cat*, содержащая кодирующую последовательность бактериального гена хлорамфениколацетилтрансферазы, также позволяет отбирать клоны трансформантов разных культур клеток на среде с хлорамфениколом.

Замена в векторах pSV-серии промотора p_E вируса SV40 на промотор и усилитель транскрипции из длинного концевого повтора ДНК провируса саркомы Рауса или других ретровирусов приводит к тому, что в ряде культур клеток увеличивается эффективность транскрипции генов *cat*, *neo*, *gpt* и, как следствие, повышается частота образования соответствующих стабильных трансформантов. Причем для разных усилителей характерен свой специфичный спектр культур клеток, на которых проявляется их роль активатора транскрипции.

Г. Спивак с соавторами (1984 г.) показали, что частота генетической трансформации клеток плазмидами pSV2-серии значительно возрастает после мутагенной обработки плазмид *in vitro* УФ-лучами. В данном случае наблюдаемый эффект, по-видимому, обусловлен повышением частоты рекомбинации модифицированных молекул ДНК. Производные pSV2, совместно введенные в клетки млекопитающих, рекомбинируют между собой по областям гомологии. При этом эффективность рекомбинации значительно увеличивается, если одну из плазмид в участке, по которому осуществляется рекомбинация, расщепить рестриктазой или с помощью ферментов вырезать небольшой фрагмент. Полученные данные аналогичны описанным ранее для рекомбинационной интеграции гибридных плазмид в геном клеток дрожжей по областям гомологии (см. 12.4.1).

Рассмотренные эписомные векторы генетической трансформации доминантного типа дают возможность вводить любые встроенные в них гены в самые различные культуры клеток. В результате амплификации (коамплификации) целевого гена часто может быть достигнута суперпродукция кодируемого им белка.

Чужеродные гены можно вводить в клетки и не объединяя их с эписомными векторами, т. е. в процессе котрансформации. При этом не требуется клонировать целевой ген из донорного генома. Элегантную работу выполнили Г. Узе с соавторами (1990 г.), трансформировав культуру клеток мыши одновременно плазмидой pSV2-*neo* и препаратом хромосомной ДНК человека. После селекции клонов, устойчивых к G-418, их проверяли на чувствительность к лейкоцитарному интерферону человека. Следует отметить, что действие интерферона является видоспецифичным и определяется наличием на поверхности клеток соответствующих рецепторов. Нормальные клетки мыши нечувствительны к интерферону человека, если в них не индуцировать синтез рецепторов к данному белку. Анализ клонов клеток мыши, отобранных после котрансформации с pSV2-*neo*, показал, что могут быть успешно получены линии клеток, синтезирующие рецептор интерферона человека и тем самым приобретшие к нему чувствительность. Таким образом, данная методология позволяет создавать новые типы культур клеток и использовать их не только для продукции чужеродных белков, но и в исследовательских целях.

13.3.5. Регулируемая экспрессия целевых генов

При изучении функции генов в таком сложном генетическом окружении, которое характерно для клеток млекопитающих, может возникать потребность в регулируемом «включении–выключении» конкретного гена. Поэтому в разных лабораториях предпринимались попытки контролировать активность вводимых в клетки млекопитающих трансгенов, используя индуцируемые эукариотические промоторы. Первыми были испытаны промоторы, индуцируемые катионами тяжелых металлов, гормонами или тепловым шоком. Основным недостатком этих систем было то, что индукция приводила к плеотропным эффектам, так как активировались не только трансгены, но и ряд собственных генов клеток.

В поисках регуляторных систем, не оказывающих влияния на эндогенные контрольные элементы клетки, внимание исследователей прежде всего привлекла система репрес-

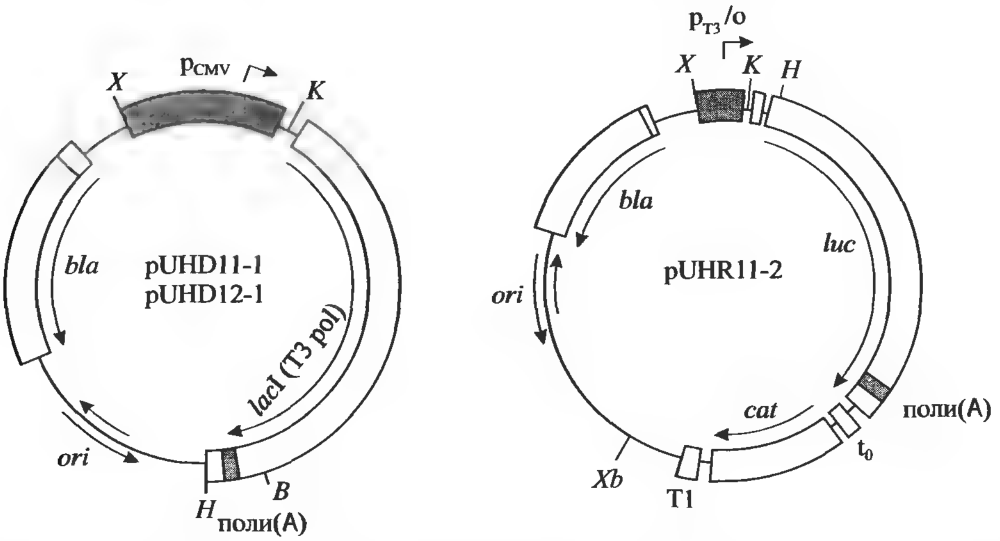


Рис. 13.10. Гибридные плазмиды, использованные для создания системы регулируемой экспрессии целевых генов в культуре клеток млекопитающих

p_{CMV} — промотор цитомегаловируса, p_{T3}/o — промотор фага T3, соединенный с синтетической последовательностью оператора лактозного оперона *E. coli*; T1, t_0 — терминаторы транскрипции. Сайты рестриктаз: *X* — *Xho*I, *K* — *Kpn*I, *H* — *Hin*dIII, *B* — *Bam*HI, *Xb* — *Xba*I

сор–оператор–индуктор лактозного оперона *E. coli* (см. 2.2.6, рис. 2.28). В 1989 г. группа ученых, руководимая Х. Бужардом, предложила систему регулируемой экспрессии трансгенов в клетках млекопитающих под контролем РНК-полимеразы колифага T3 и *lac*-репрессора. Были созданы плазмиды pUHD11-1 и pUHD12-1, в которых под контроль промоторно-энхансерного района немедленного раннего гена *IE*1 цитомегаловируса человека (hCMV) встроили кодирующие последовательности генов *lac*I *E. coli* или РНК-полимеразы фага T3 соответственно (рис. 13.10). В третьей плазмиде pUHR11-2 под контроль синтетического сегмента ДНК размером 49 пн, состоящего из последовательностей промотора фага T3 и *lac*-оператора (o_{lac}), поместили кодирующую последовательность гена *luc* люциферазы светляка *Photinus pyralis*. Данные плазмиды не имели селективных маркеров, экспрессируемых в клетках млекопитающих.

На первом этапе получили стабильную линию клеток почки кролика RK-T3, продуцирующую РНК-полимеразу фага T3. Для этого линию клеток RK13 кальций-фосфатным методом трансформировали смесью плазмид pUHD12-1 и pNEO5, несущей селективный маркер для клеток млекопитающих, и отбирали клоны трансформантов на среде с антибиотиком G-418. Среди устойчивых к G-418 клонов клеток выявляли те, которые продуцировали фаговую РНК-полимеразу. Созданную линию RK-T3 котрансформировали плазмидами pUHD11-1 и pHM24 (несет ген устойчивости к гигромицину Б) и отбирали клоны на среде с гигромицином. Линия клеток, одновременно продуцирующая фаговую РНК-полимеразу и *lac*-репрессор, получила название RK-T3i.

Микроинъекцией плазмиду pUHR11-2 вводили в клетки линии RK-T3i и анализировали в них продукцию люциферазы без добавления и при добавлении в питательную среду индуктора лактозного оперона ИПТГ. Оказалось, что в отсутствие индуктора уровень активности люциферазы в клетках был очень низким, а добавление ИПТГ приводило к увеличению активности этого фермента в 150 раз.

В 1991 г. С. Бэйм с соавторами предложили более простую систему контролируемой экспрессии трансгена в клетках млекопитающих на основе *lac*I. Они создали ген химерного трансактиваторного белка LAP267 (рис. 13.11), в котором объединены свойства двух разных белков — *lac*-репрессора *E. coli* и вирионного белка VP16 вируса простого герпеса. В *lac*-репрессоре первые 59 АК составляют ДНК-связывающий домен. Второй домен, состоящий из последовательности аминокислот 60–320, необходим для связывания индуктора (аллостерической регуляции) и димеризации белка. Третий, С-концевой домен необходим для агрегации димеров и формирования активных тетрамеров. Белок VP16 вируса простого герпеса является трансиндуцирующим фактором α-генов (ранние вирусные гены, транскрибируемые РНК-полимеразой клеток млекопитающих) и содер-

жит активаторный домен в своем С-концевом районе. Кодирующую последовательность этого домена встроили между триплетами, соответствующими аминокислотным остаткам 267 и 268 *lac*-репрессора. На N-конце химерный белок LAP267 содержал пептидный сигнал ядерной локализации NLS (nuclear localization signal) большого Т-антигена вируса SV40.

Затем были получены варианты гена белка LAP267 с транскрипцией, направляемой с промотора гена *IE*1 цитомегаловируса человека или промотора гена β-актина человека. В полученных стабильных по гену белка LAP267 трансформантах клеток млекопитающих на примере репортерного гена *cat*, находящегося под контролем минимального раннего промотора (промотор без последовательностей энхансера, см. рис. 14.2) вируса SV40, соединенного с предшествующими ему несколькими копиями *lac*-оператора, было показано, что созданный трансактиваторный белок LAP267 является термочувствительным вариантом *lac*-репрессора. При непермиссивной температуре 39,5 °С он не связывается с последовательностями *lac*-оператора, но добавление небольших концентраций ИПТГ (5 нМ) приводит к восстановлению функции специфического связывания с ДНК. Такими же свойствами обладали ранее известные мутанты *lac*I^{rc}. В результате оказалось, что при температуре 39,5 °С LAP267 не индуцирует транскрипцию целевого трансгена с минимального промотора, объединенного с последовательностями *lac*-оператора, но активирует экспрессию такого гена при добавлении в среду ИПТГ. Это приводит к тому, что накопление продукта трансгена — хлорамфениколацетилтрансферазы — возрастает в сотни раз и достигает максимума через 24 ч.

Использование индуцируемой системы репрессор–оператор лактозного оперона *E. coli* в клетках млекопитающих, несмотря на быстрое поглощение и внутриклеточную стабильность ИПТГ, оказалось ограниченным из-за медленного и неэффективного действия индуктора, вызывающего только умеренную активацию транскрипции целевых генов.

В 1992 г. М. Госсен и Х. Бужард разработали более эффективную систему регулируемой экспрессии трансгенов в клетках млекопитающих. Они использовали регуляторные элементы оперона устойчивости к тетрациклину транспозона Tn*10 E. coli*, транскрипция которого негативно регулируется *tet*-репрессором (tetR). В присутствии антибиотика тетрациклина tetR не связывается с операторами, расположенными в про-

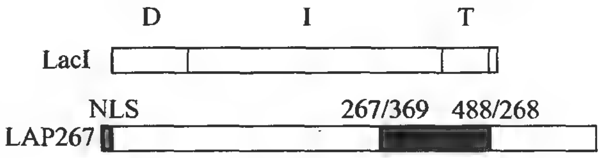


Рис. 13.11. Структура репрессора LacI лактозного оперона и созданного на его основе химерного белка LAP267.

D — ДНК-связывающий домен; I — индуктор связывания и димеризации; T — домен тетрамеризации

моторной области *tet*-оперона, и это приводит к инициации транскрипции данного оперона. Объединив кодирующие последовательности tetR и С-концевого активаторного домена белка VP16 вируса простого герпеса, создали контролируемый промотором гена *IE*1 цитомегаловируса человека ген химерного трансактиватора tTA (рис. 13.12, *а*), способного стимулировать транскрипцию с минимального вирусного промотора, объединенного с последовательностями *tet*-оператора.

Минимальный промотор p_{hCMV*} представляет собой промотор hCMV, в котором удалена последовательность усилителя транскрипции в сегменте от –675 до –53 относительно точки инициации транскрипции (+1). Объединение данного минимального промотора (район от –53 до +75) с семикратно повторенной последовательностью оператора о2 транспозона Tn*10* привело к формированию промоторов $p_{hCMV*-1}$ и $p_{hCMV*-2}$ (см. рис. 13.12, *б*). Данные промоторы были состыкованы с кодирующей последовательностью люциферазы *Photinus pyralis*, ограниченной на 3′-конце сигналом полиаденилирования вируса SV40.

Созданные гибридные гены использовали для оценки регулирования экспрессии люциферазы трансактиватором tTA. Прежде всего получили клон клеток HeLa, обозначенный HtTA-1, конститутивно продуцирующий tTA. Затем линию HtTA-1 трансформировали плазмидами pUHC13-3 или pUHC13-4 (см. рис. 13.12, *б*), отбирали клоны клеток по устойчивости к антибиотику гигромицину и определяли в них уровень продукции люциферазы при добавлении в питательную среду тетрациклина или при его отсутствии. Оказалось, что добавление тетрациклина до концентрации 1 мкг/мл эффективно подавляет транскрипцию люциферазного гена. Удаление тетрациклина из среды приводит к быстрой активации транскрипции трансгена и увеличению продукции люциферазы в разных клонах трансформантов в 10^2–10^5 раз. При концентрации тетрациклина в среде 0,1 мкг/мл на-

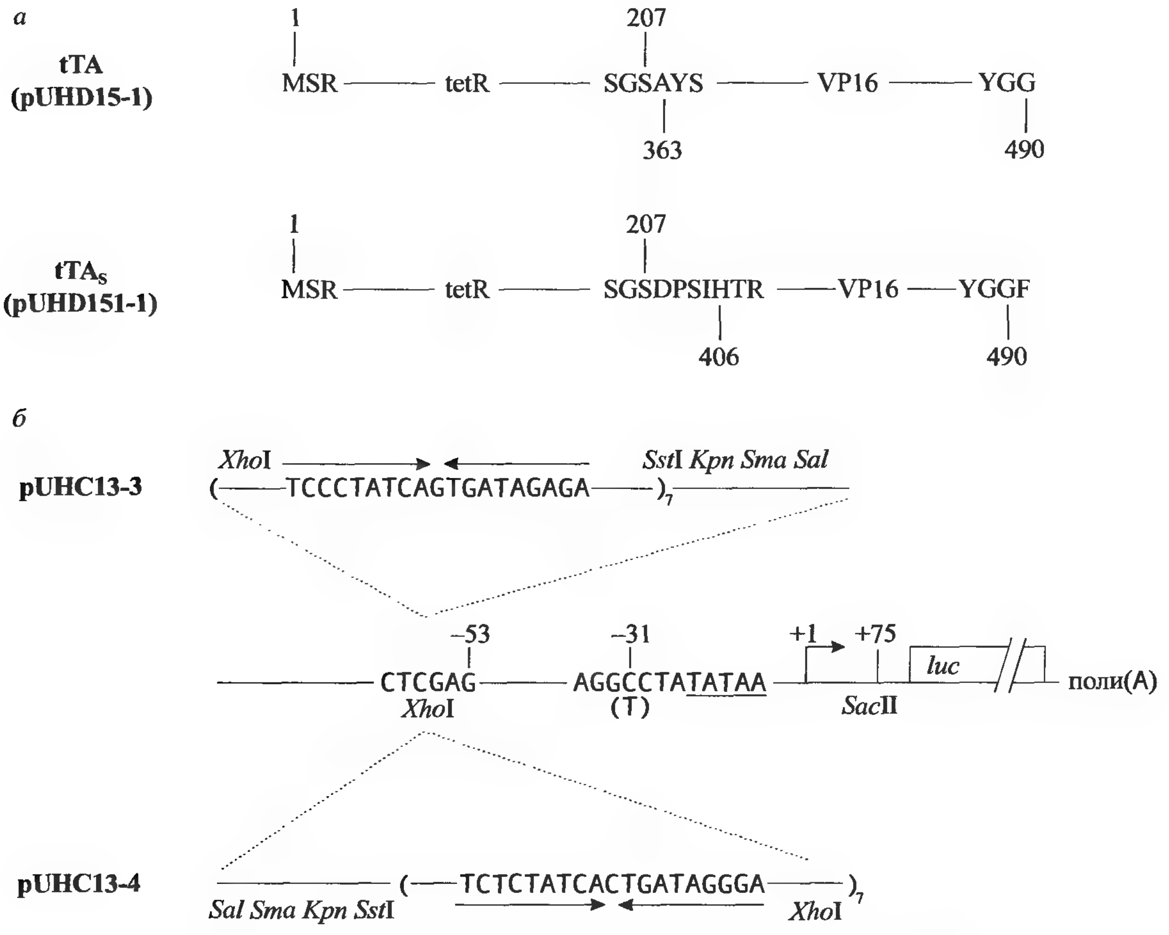


Рис. 13.12. Структура химерных трансактиваторных полипептидов (*а*) и tTA-зависимой транскрипционной единицы (*б*).

tTA-зависимая транскрипционная единица состоит из кодирующей последовательности люциферазы, участка полиаденилирования мРНК вируса SV40 и раннего цитомегаловирусного промотора, соединенного с семикратно повторенной последовательностью оператора o_{tet}, расположенного в прямой (pUHC13-3, p_{hCMV^*-1}) и обратной (pUHC13-4, p_{hCMV^*-2}) ориентации

блюдалось частичное ингибирование транскрипции с tTA-зависимого промотора.

В 1995 г. М. Госсен с соавторами описали более удобную систему «обратного» тетрациклин-контролируемого трансактиватора rtTA (от англ. reverse Tc-controlled transactivator) для клеток млекопитающих. Эта система отличается от ранее разработанной тем, что в последовательность белка tetR введены 4 аминокислотные замены. Это привело к появлению обратного фенотипа репрессора (rtetR): белку rtTA для связывания с последовательностью *tet*-оператора и активации транскрипции необходим аналог тетрациклина доксициклин. В отсутствие данного антибиотика rtTA не активирует транскрипцию целевого регулируемого гена.

Благодаря простоте, эффективности, универсальности и нетоксичности разработанные системы регулирования экспрессии трансгенов стали в дальнейшем использовать не только в культурах клеток, но и в трансгенных животных и растениях.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Щелкунов С. Н. Клонирование генов. Новосибирск: Наука, 1986. 228 с.

Baim S. B., Labow M. A., Levine A. J., Shenk T. A chimeric mammalian transactivator based on the *lac* repressor that is regulated by temperature and isopropyl β-D-thiogalactopyranoside // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1991. Vol. 88. P. 5072–5076.

Berg P. E., Sheffery M., King R. S. et al. The expression of integrated plasmid DNA depends on copy number // Exp. Cell. Res. 1987. Vol. 168. P. 376–288.

Bottger M., Vogel F., Platzer M. et al. Condensation of vector DNA by the chromosomal protein HMG1 results in efficient transfection // Biochim. Biophys. Acta. 1988. Vol. 950. P. 221–228.

Deuschle U., Pepperkok R., Wang F. et al. Regulated expression of foreign genes in mammalian cells under the control of coliphage T3 RNA polymerase and *lac* repressor // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. Vol. 86. P. 5400–5404.

Gossen M., Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1992. Vol. 89. P. 5547–5551.

Sasada R., Onda H., Igarashi K. The establishment of IL-2 producing cells by genetic engineering // Cell Structure Function. 1987. Vol. 12. P. 205–217.

Stark G. R., Debatisse M., Glulotto E., Wahl G. M. Recent progress in understanding mechanisms of mammalian DNA amplification // Cell. 1989. Vol. 57. P. 901–908.

Szelei J., Duba E. Entrapment of high-molecular-mass DNA molecules in liposomes for the genetic transformation of animal cells // Biochem. J. 1989. Vol. 259. P. 549–553.

Wigler M., Sweet R., Sim G. K. et al. Transformation of mammalian cells with genes from procaryotes and eukaryotes // Cell. 1979. Vol. 16. P. 777–785.

Zheng H., Wilson J. H. Gene targeting in normal and amplified cell lines // Nature. 1990. Vol. 344. P. 170–172.

Глава 14
ВЕКТОРНЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ

14.1. ВИРУС SV40 КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ВЕКТОР

Молекулярные клонирующие векторы играют ключевую роль в постановке генно-инженерных экспериментов на выбранной системе клеток. В системе клеток прокариот и низших эукариот в качестве векторных молекул используют плазмиды или ДНК вирусов. В культивируемых клетках млекопитающих эндогенные плазмиды не найдены, поэтому внимание исследователей сконцентрировалось на ДНК-содержащих вирусах. К моменту появления генно-инженерной методологии наиболее хорошо изученным в генетическом и биохимическом плане был вирус SV40. Имелись методы наработки и очистки данного вируса, выделения его ДНК и трансфекции ею чувствительных культур клеток. Поэтому именно на основе ДНК вируса SV40 были созданы первые клонирующие векторы культивируемых клеток млекопитающих.

14.1.1. Структурно-функциональная организация генома SV40

Вирус SV40 относится к роду *Polyomavirus* семейства Polyomaviridae и является мелким вирусом, двухцепочечная кольцевая ДНК которого реплицируется в ядре хозяйской клетки. Подобно умеренным фагам ДНК вируса SV40 может размножаться вегетативно (в пермиссивных для литического развития клетках) или в интегрированном в хромосомы состоянии (в непермиссивных клетках). Хотя вирус SV40 выделен из первичной культуры клеток почки макака резус, наиболее эффективно он размножается на первичных или перевиваемых линиях клеток почки африканской зеленой мартышки, таких как Vero, CV-1, BSC-1 и некоторых других. При инфекции пермиссивных клеток происходит лизис клеток с выходом в среду вирусного потомства. В непермиссивных клетках ДНК вируса интегрируется в геном, обусловливая онкогенную трансформацию клеток.

Известна полная последовательность 5243 пн ДНК вируса SV40. Имеется подробная информация о внутриклеточной организации и репликации генома данного вируса, составлена детальная физическая карта ДНК, на которой локализованы области генома, ответственные за различные вирусные функции, изучена регуляция экспрессии вирусного генома в различных клетках млекопитающих.

Кольцевая ДНК вируса SV40 — яркий пример экономного использования последовательности нуклеотидов для кодирования различных функций. Гены вируса SV40 в значительной степени перекрываются (рис. 14.1). Область начала репликации перекрывается с промоторными последовательностями, направляющими раннюю (p_E) и позднюю (p_L) транскрипцию.

Ранний промотор вируса SV40 устроен относительно сложно. Он содержит характерный для эукариотических промоторов ТАТА-бокс (блок Хогнесса) на расстоянии 30 пн от точки инициации транскрипции (см. 4.1). Дополнительные элементы промотора расположены на расстоянии 115 пн от точки инициации и представляют собой три прямых повтора последовательности длиной 21 пн (рис. 14.2). С этой областью связывается клеточный фактор SP1. Затем SP1 взаимодействует с другими белками, в результате чего формируется комплекс, необходимый для эффективной транскрипции РНК-полимеразой II.

В процессе ранней транскрипции происходит синтез пре-мРНК, которая при фракционировании в градиенте плотности сахарозы имеет коэффициент седиментации 19S. В результате альтернативного сплайсинга из пре-мРНК формируются молекулы зрелых мРНК, кодирующие большой (T) и малый (t) т-антигены (см.

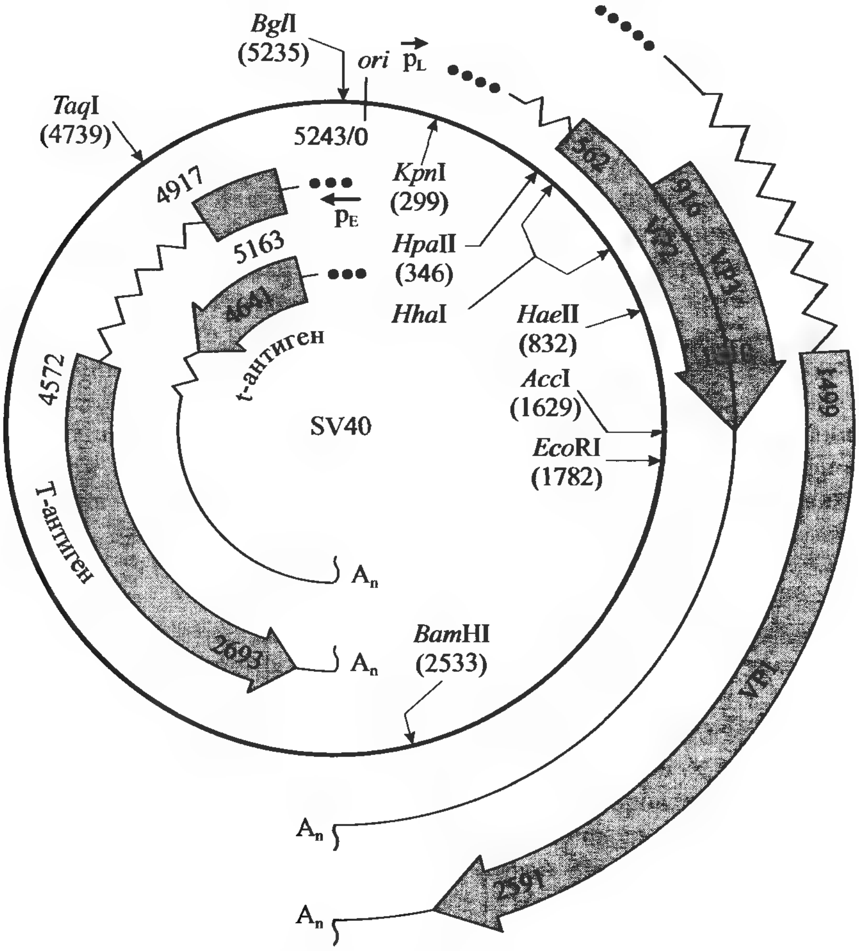


Рис. 14.1. Молекулярно-генетическая организация генома вируса SV40.

Толстые стрелки — последовательности вирусных мРНК, кодирующие соответствующие белки; зигзагообразные линии – интроны молекул мРНК; A_n — участки полиаденилирования.

Цифрами отмечено положение соответствующих точек на физической карте ДНК (в парах нуклеотидов)

рис. 14.1). Т-антиген (фосфопротеин размером 708 АК) является единственным белком вируса SV40, который необходим для эффективной репликации вирусной ДНК в инфицированных клетках. Показано, что он обладает ДНК-хеликазной активностью. Это позволяет вирусу преодолеть существующий в нормальных клетках контроль репликации ДНК в течение клеточного цикла. Эндогенная хеликаза клетки предотвращает реинициацию репликации вновь синтезированной ДНК до тех пор, пока не завершится репликация всей хромосомы. Вирусная Т-хеликаза, входящая в репликативный ферментный комплекс SV40, отличается от клеточной тем, что обусловливает эффективную многократную инициацию репликации вирусной ДНК на протяжении одного цикла деления клетки.

Т-антиген осуществляет авторегуляцию экспрессии своего гена. При повышенной концентрации в клетке он связывается с участками 3 и 1′ (см. рис. 14.2) на ДНК SV40 и подавляет раннюю транскрипцию.

Большой Т-антиген является многофункциональным белком. Он также способен индуцировать и поддерживать состояние онкогенной (неопластической) трансформации широкого спектра культур клеток млекопитающих. При инфицировании культур, непермиссивных для продуктивного развития SV40, вирусная ДНК встраивается в геном клетки, причем во множественных копиях. Интеграция иногда может сопровождаться и внутренними перестройками вирусной ДНК. Внедрение вирусного генома в хромосомную ДНК реципиентной клетки, по-видимому, не является сайтспецифическим. Трансформированное состояние клеток может стабильно сохраняться длительное время. При слиянии трансформированных клеток с клетками, пермиссивными для литического развития вируса SV40, происходит исключение провируса и образуется инфекционное вирусное потомство.

Малый t-антиген (размер 174 АК) в зависимости от используемой культуры клеток или аб-

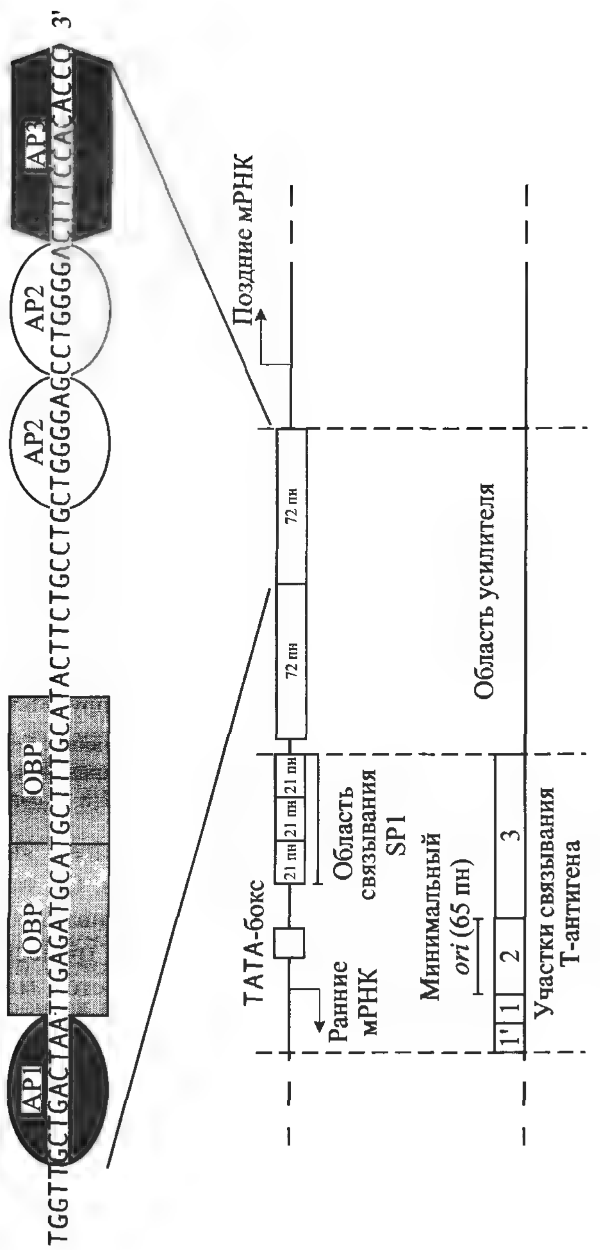


Рис. 14.2. Область контроля транскрипции и репликации генома SV40.

AP1, OBP, AP2, AP3, SP1 — белковые факторы клетки, связывающиеся с соответствующими районами вирусной ДНК

солютно необходим для неопластической трансформации наряду с Т-антигеном, или усиливает его действие, или не требуется вовсе.

Поздняя транскрипция (после начала репликации ДНК) осуществляется с другой цепи вирусной ДНК (см. рис. 14.1). Для позднего промотора не выявлено такой четкой структурной организации, как для промотора p_E. Показано, что поздние РНК SV40 гетерогенны по 5′-концам. Поэтому полагают, что p_L представляет собой множественные перекрывающиеся промоторы, функционирование которых приводит к синтезу молекул мРНК, различающихся по 5′-концам. При этом поздние мРНК образуют два класса молекул — с коэффициентом седиментации 16S и 19S, с которых считываются вирионные белки VP1, VP2 и VP3, формирующие вирусные частицы.

Участок *ori* является единственным районом генома SV40, который необходим в *цис*-положении для репликации вирусной ДНК. Остальные генетические элементы вируса могут находиться в *транс*-положении, т. е. любые мутанты вируса SV40 с неповрежденным репликатором могут образовывать потомство в присутствии в клетке вируса-помощника.

In vivo вся молекула ДНК вируса имеет нуклеосомную организацию за исключением области начала репликации и прилегающего к ней участка, представляющего собой тандемный повтор последовательности размером 72 пн (см. рис. 14.2). К. Бенойст и П. Шамбон (1981 г.) показали, что делеция одной из этих последовательностей не влияет существенно на экспрессию ранних генов SV40. Однако если дополнительно удалить часть второй последовательности, экспрессия ранних генов значительно снизится.

Дальнейшая характеризация этих последовательностей привела к удивительным результатам. Дж. Бэнерджи с соавторами (1981 г.), подстроив данный сегмент ДНК SV40 к гену β-глобина, обнаружили увеличение транскрипции последнего в 200 раз. Последовательность 72 пн была названа ***усилителем транскрипции***, или ***энхансером*** (enhancer). Ее действие проявляется только в *цис*-положении. Экспериментально показано, что перенесение данного тандемного повтора в другие области генома вируса в различных ориентациях также обусловливает усиление транскрипции ДНК SV40. При этом и в местах необычной локализации на вирусной ДНК повтор последовательности 72 пн не имеет нуклеосомной организации.

Усилители транскрипции удалось обнаружить у многих других вирусов, а также в геноме эукариотических клеток. Усилители представляют собой короткие (от 30 до 100 пн), часто тандемно повторенные последовательности. Эти *цис*-действующие элементы значительно увеличивают эффективность транскрипции с промоторов лишь в присутствии определенных *транс*-действующих регуляторных белков. Например, для функционирования усилителя SV40 требуется не менее четырех белков клетки-хозяина (см. рис. 14.2). Таким образом, усилители организованы относительно сложно и состоят из набора субэлементов. Благодаря своей структурной организации они могут действовать как тканеспецифичные генетические элементы, а также проявляться лишь на определенных стадиях развития организма или в ответ на какое-либо воздействие. Большинство усилителей значительно различаются по последовательности нуклеотидов, что указывает на индивидуальный механизм регулирования функций каждого такого элемента.

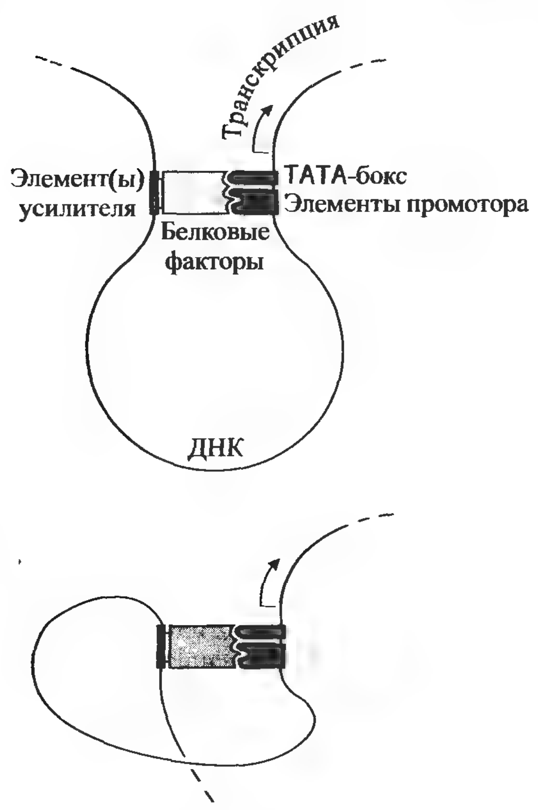
Важная особенность усилителей состоит в том, что они могут активировать транскрипцию с промоторов, расположенных на расстоянии от нескольких сотен пар нуклеотидов до 10 тпн. При этом эффект усилителя не зависит от его ориентации относительно промотора. Другим свойством усилителей, имеющим большое значение для генетической инженерии эукариот, является то, что эти элементы могут увеличивать эффективность транскрипции при подстройке их как к гомологичным, так и к гетерологичным промоторам.

Кроме усилителей транскрипции у эукариот обнаружены *цис*-действующие последовательности, обусловливающие репрессию транскрипции. Они получили название ***глушители транскрипции***, или ***сайленсеры*** (silencer). Глушители подавляют транскрипцию независимо от их ориентации относительно промотора и могут проявлять свои свойства на некотором расстоянии от регулируемого гена. Для функционирования глушителей необходимы *транс*-действующие белковые факторы, способные связываться с их последовательностями.

Таким образом, усилители и глушители транскрипции у эукариот в совокупности обеспечивают тонкое регулирование тканеспецифичной и стадиеспецифичной экспрессии генов. Регуляторными сигналами при этом служат различные белковые факторы клетки (их наличие и концентрация).

Существует несколько моделей функционирования усилителей и глушителей транскрипции. Полагают, что в основе регулирования

а



б

Рис. 14.3. Модель функционирования усилителя транскрипции:

а, б — разные ориентации усилителя относительно промотора

уровня транскрипции лежит белок-белковое взаимодействие. *транс*-Действующие белковые факторы могут взаимодействовать с элементами усилителя (глушителя) через свои ДНК-связывающие домены. Белок-связывающие домены образовавшегося комплекса способны взаимодействовать с комплексом белков, связанных с ДНК в районе инициации транскрипции гена (рис. 14.3). В результате такого белок-белкового узнавания образуется петля ДНК, а сформировавшийся комплекс усиливает (для глушителя — ослабляет) транскрипцию регулируемого гена. Не исключаются и другие механизмы действия этих элементов.

Репликация ДНК SV40 инициируется в единственном участке *ori*, минимальный размер которого определен в 65 пн, и происходит двунаправленно. В целом необходимо подчеркнуть, что вирус SV40 является замечательной лабораторной моделью, которая дает возможность изучать закономерности таких процессов у эукариот, как регуляция экспрессии генов, репликация ДНК, сплайсинг пре-мРНК, ДНК-белковые взаимодействия и др. Прекрасная изученность позволяет с высокой степенью осмысленности использовать вирус SV40 для конструирования молекулярных векторов.

14.1.2. Литические векторы на основе ДНК вируса SV40

Из-за насыщенности генетической структуры вируса SV40 лишь в ограниченном числе мест на его ДНК могут происходить незначительные перестройки типа вставок или делеций без потери жизнеспособности вируса. При встройке в ДНК данного вируса чужеродного фрагмента по любому из уникальных мест гидролиза рестриктазами будет происходить нарушение той или иной функции (см. рис. 14.1), т. е. гибридные вирусы SV40 будут дефектны. Чтобы гибридная ДНК могла упаковаться в вирусный капсид, ее размер должен составлять 70–100 % генома вируса. Поэтому для получения гибридного вирусного потомства необходимо чужеродный фрагмент ДНК встраивать в молекулу вирусной ДНК, у которой предварительно с помощью рестриктаз делетирован определенный район. Такие векторы являются векторами замещения. Обязательное условие при конструировании гибридных вирусов — сохранение неповрежденной области начала репликации вирусной ДНК. Нарушенные при встройке в векторную ДНК другие вирусные функции необходимо комплементировать с помощью вируса-помощника. Молекулярные векторы данного типа на основе ДНК вируса SV40 называют ***литическими векторами***.

В большей части выполненных исследований гибридные вирусы SV40 получены замещением участка ДНК из области поздних генов вируса фрагментом чужеродной ДНК. Гибриды данного типа содержат полностью область ранних генов и репликатор вируса SV40 и могут размножаться в виде вирусных частиц при совместной инфекции пермиссивных клеток с вирусом-помощником дикого типа или термочувствительным мутантом по ранним генам (обычно *ts*A).

Для встройки фрагментов ДНК в область поздних генов вируса SV40 можно использовать рестриктазы *Hpa*II, *Eco*RI, *Bam*HI, *Hae*II, *Acc*I, *Kpn*I, имеющие уникальные места гидролиза на вирусной ДНК, а также *Hha*I, имеющую два участка гидролиза (см. рис. 14.1). При использовании других рестриктаз обычно проводят неполный гидролиз вирусной ДНК, продукты гидролиза разделяют электрофорезом и векторный фрагмент ДНК SV40 выделяют из геля.

Одна из первых работ по клонированию экзогенной генетической информации в клетках

млекопитающих была выполнена в лаборатории П. Берга (1976 г.). Область поздних генов вируса SV40 удалили *in vitro* при помощи рестриктаз *Hpa*II и *Bam*HI и на ее место встроили коннекторным способом фрагмент ДНК фага λ, содержащий область начала репликации фаговой ДНК и гены *c*II, *cro*. Гибридная ДНК стабильно размножалась в клетках, инфицированных вирусом-помощником SV40*ts*A58. Авторам удалось выявить в инфицированных клетках лишь низкий уровень РНК, специфичной для фага λ. Трансляции фаговых белков обнаружено не было.

По схожей схеме Д. Хэмер с соавторами (1977 г.) сконструировали гибридный вирус SV40-тРНК^{Tyr}*su*$^{+}$III. В качестве вектора использовали *Hpa*II–*Eco*RI-фрагмент ДНК SV40, содержащий область начала репликации вирусной ДНК и ранние гены. К этому фрагменту ДНК пришивали *Hpa*II–*Eco*RI-фрагмент ДНК *E. coli*, несущий ген супрессорной тирозиновой тРНК. Гибридная ДНК реплицировалась в клетках млекопитающих и в присутствии продуктов поздних генов вируса-помощника паковалась в капсид, образуя дефектные вирусные частицы. Гибридная ДНК была стабильна при пассажах клеток, а эффективность ее репликации была сравнима с эффективностью репликации ДНК вируса-помощника. Гибридизацией нуклеиновых кислот доказано, что в клетках африканской зеленой мартышки возможна транскрипция чужеродной ДНК, входящей в состав гибридного дефектного вируса. Однако попытки обнаружить функционально активные молекулы тРНК^{Tyr}*su*$^{+}$III не увенчались успехом.

Экспрессия эукариотического гена, клонированного в составе ДНК вируса SV40, впервые была достигнута в лаборатории П. Берга (1979 г.) после создания гибридного генома, в котором почти всю последовательность, кодирующую основной капсидный белок VP1, заменили на кДНК β-глобина кролика (рис. 14.4). Клетки, инфицированные гибридным вирусом SVGT5-RaβG совместно с SV40*ts*A58, продуцировали существенные количества дискретной гибридной мРНК, которая содержала последовательность, кодирующую β-глобин. С 5′- и 3′-концов она была ограничена последовательностями, характеристичными для поздней мРНК вируса SV40. В инфицированных клетках также синтезировался β-глобин в количествах, сравнимых с количеством VP1, продуцируемого коинфицирующим вирусом-помощником.

Р. Маллигэн и П. Берг (1980 г.) встроили в вектор SVGT5 ген ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (XGPRT) *E. coli*. При совместной инфекции пермиссивных клеток полученным гибридным вирусом SVGT5-*gpt* и вирусом-помощником наблюдали продукцию фермента XGPRT, специфичного для бактерии *E. coli*.

По аналогичной схеме К. Выховски с соавторами (1985 г.) в состав SVGT5 ввели фрагмент кДНК геномной РНК полиовируса, кодирующий его капсидный полипептид VP1. При коинфекции клеток CV-1 полученным гибридным вирусом SV40-VP1polio и вирусом-помощником SV40*am*404 происходил синтез химерного белка, на N-конце которого находились 94 АК полипептида VP1 вируса SV40, а затем следовали 302 АК полиовирусного капсидного полипептида VP1. Данный белок специфично иммунопреципитировался поликлональными антителами против полиовирусных капсидов или моноклональными антителами против VP1 полиовируса. Химерный белок мигрировал в ядро клетки, хотя VP1 полиовируса имеет цитоплазматическую локализацию. Это указывает на то, что N-концевая часть VP1 вируса SV40 содержит аминокислотную последовательность, являющуюся сигналом для транспорта белка из цитоплазмы в ядро.

Таким образом, ДНК SVGT5 может успешно применяться в качестве экспрессирующего литического вектора при клонировании чужеродных кодирующих последовательностей. При этом следует отметить, что в конструируемых генах гибридных вирусов SV40 эффективно используются сигналы инициации и терминации транскрипции, сплайсинга и полиаденилирования поздней мРНК вируса.

Для осуществления генно-инженерных экспериментов большое значение имеет возможность правильного сплайсинга чужеродных молекул пре-мРНК, кодируемых хромосомными генами эукариот, клонированными в составе SV40. Одну из первых работ, в которых изучался данный вопрос, выполнили в 1981 г. П. Грас и Г. Хори. В ДНК вируса SV40 вместо области поздних генов был встроен полный ген пре-проинсулина I (*rI*$_1$) крысы, содержащий один интрон (119 пн) в 5′-некодирующей области (рис. 14.5). При инфекции клеток зеленой мартышки гибридным вирусом с клонированной последовательности считывались стабильные транскрипты. Анализ показал, что в сплайсинг и полиаденилирование мРНК пре-проинсулина вовлечены эндогенные сигналы *rI*$_1$. Синтезируемый в значительных количествах пре-проинсулин эффективно секретировался

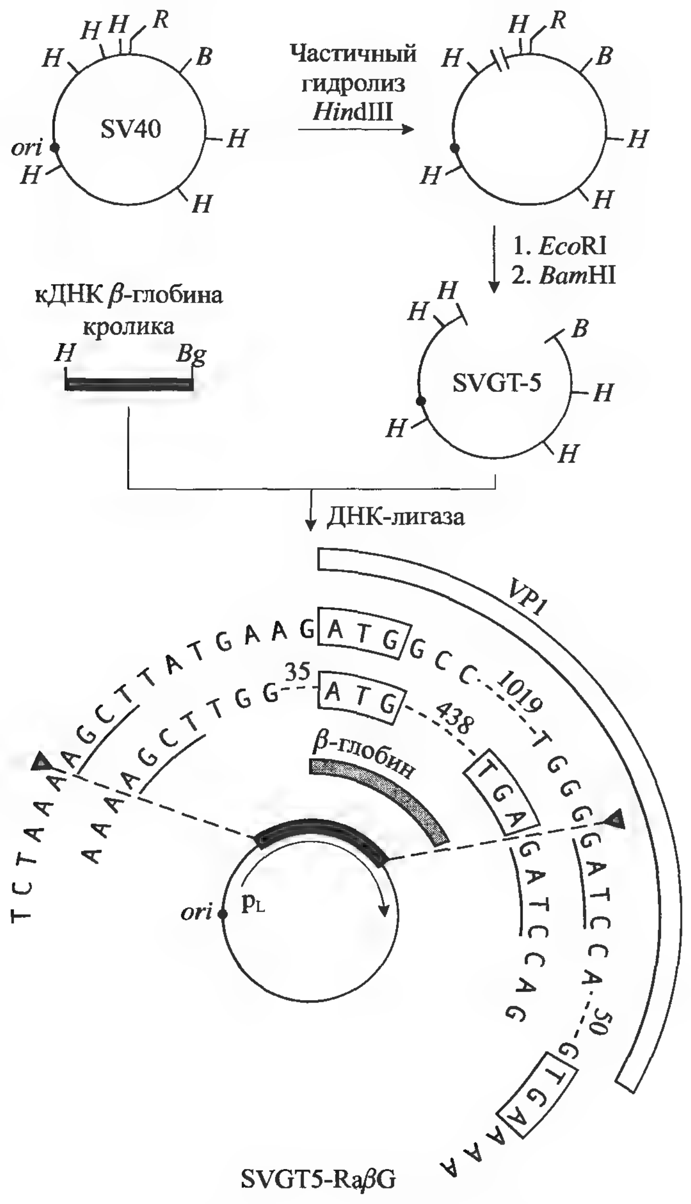


Рис. 14.4. Схема конструирования гибридной ДНК SVGT5-RaβG.

Треугольниками отмечены участки встройки в геном SV40 ген-эквивалента β-глобина кролика (внутренний круг) вместо области гена *VP*1 (внешний круг). Цифрами обозначена длина пропусков (пн) в представленных последовательностях. Рамками обведены инициаторные и терминаторные триплеты. Подчеркнуты последовательности липких концов, по которым состыкованы фрагменты. *H* — сайт рестрикции *Hin*dIII, *R* — *Eco*RI, *B* — *Bam*HI, *Bg* — *Bgl*II

в культуральную среду в виде проинсулина (в процессе секреции отщеплялся гидрофобный сигнальный пептид). Однако внутренний С-пептид (см. рис. 4.6) из молекулы проинсулина не выщеплялся, по-видимому, из-за отсутствия в клетках почки зеленой мартышки специфических пептидаз.

Аналогично вместо поздних генов вируса SV40 Г. Павлакис с соавторами (1981 г.) встроили хромосомный ген *hGH* гормона роста человека в двух ориентациях относительно промотора поздней транскрипции (рис. 14.6). При инфекции клеток гибридными вирусами в обоих случаях происходил синтез прогормона, который процессировался и секретировался в культуральную среду. Ген *hGH* транскрибировался со своего промотора. Однако продукция гормона роста, направляемая гибридом SV*hGH*(L), была выше. Это, по-видимому, обусловлено тем, что в данном гибридном вирусе синтез мРНК клонированного гена может индуцироваться как со своего эндогенного промотора, так и с вирусного промотора. А. Джаланко (1985 г.), встроив в область поздних генов SV40 фрагмент ДНК-копии РНК вируса леса Семлики, сконструировал гибридный вирус, который

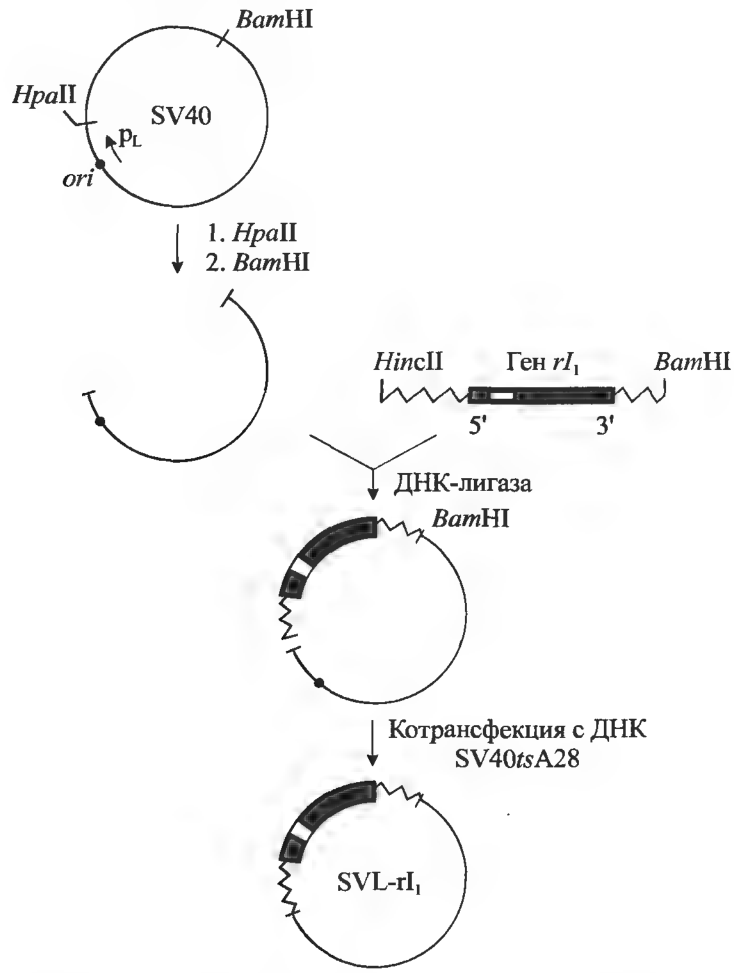


Рис. 14.5. Конструирование гибридного вируса SV40, содержащего хромосомный ген пре-проинсулина крысы rI_1. Светлым прямоугольником обозначен интрон

в присутствии вируса-помощника направлял в клетках CV-1 синтез капсидного белка вируса леса Семлики. Полученные результаты показали, что для процессинга капсидного полипротеина вируса леса Семлики не требуются другие вирусные белки.

С помощью литических векторов замещения поздних генов вируса SV40 в клетках животных изучена экспрессия ряда других эукариотических хромосомных и вирусных генов, а также ДНК-копий некоторых матричных РНК. Доказано, что в различных клетках млекопитающих механизмы инициации транскрипции генов, сплайсинга и полиаденилирования мРНК, трансляции и секреции белков во многом схожи. Кроме того, обнаружено, что синтезируемые в клетках животных чужеродные белки могут подвергаться гликозилированию. К недостаткам данных литических векторов необходимо отнести прежде всего то, что активная экспрессия клонированных генов происходит лишь на позднем этапе цикла развития гибридного вируса, который завершается лизисом клеток. После интеграции гибридной вирусной ДНК в геном непермиссивных клеток промотор поздней транскрипции вируса SV40 не функционирует, и в результате экспрессия клонированного гена может прекратиться.

В связи с этим несомненный интерес представляла разработка литических векторов замещения ранних генов вируса SV40. Для репликации ДНК таких гибридов в инфицированных клетках необходимо наличие Т-антигена. Это достигается совместной инфекцией гибридным вирусом и вирусом-помощником, дефектным по поздним функциям. Исследования по клонированию генов в векторах данного типа особенно активизировались после того, как Я. Глузман (1981 г.) получил комплементирующую линию клеток, очень удобную для работы с мутантами вируса SV40 по ранним генам. Для этого клетки CV-1 были трансформированы ДНК вируса SV40, не содержащей функционального репликатора. Выделенная линия трансформирован-

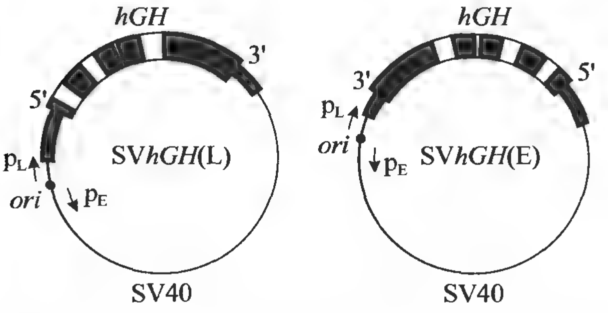


Рис. 14.6. Структура генома гибридных вирусов, содержащих ген гормона роста человека.

К векторному *Bam*HI–*Hpa*II-фрагменту ДНК вируса SV40 присоединили *Eco*RI-линкеры, по которым встроили *Eco*RI-фрагмент ДНК, содержащий ген *hGH* (широкая полоса) с четырьмя интронами (светлые участки), фланкированный последовательностями в 500 пн с 5′-конца и 550 пн с 3′-конца

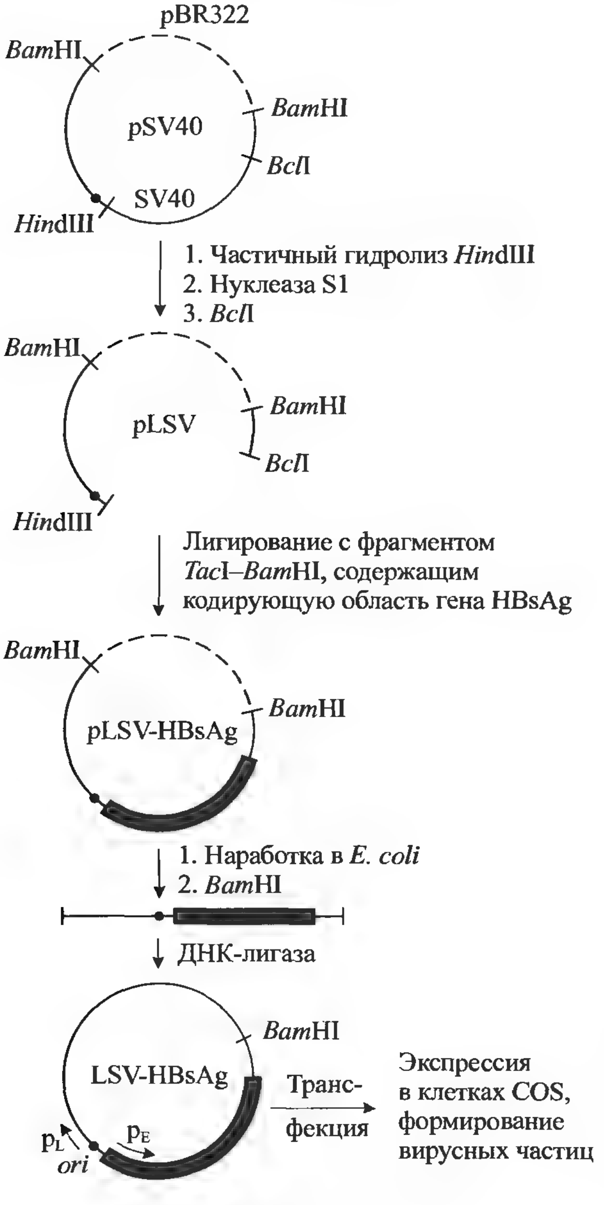


Рис. 14.7. Конструирование генома гибридного вируса LSV-HBsAg

ных клеток получила название COS. В клетках COS синтезируется Т-антиген, поэтому они обеспечивают эффективную репликацию вирусов SV40, мутантных по ранним генам. В данном случае не требуется вирус-помощник, что значительно облегчает экспериментальную работу.

Как уже указывалось, при литическом развитии вируса SV40 в клетках достигается относительно высокий уровень синтеза Т-антигена, который, связываясь с ДНК, подавляет транскрипцию с раннего промотора на поздних этапах вирусной инфекции (авторегуляция). Однако количество Т-антигена, продуцируемого клетками COS, хотя и обеспечивает эффективную репликацию с *ori* SV40, но недостаточно для репрессии транскрипции с промотора p_E. Поэтому при инфекции клеток COS гибридным вирусом замещения по ранней области обычно наблюдается суперпродукция гибридной мРНК и белка. Синтезируемые при этом гибридные мРНК подвергаются правильному сплайсингу и полиаденилированию. Было замечено, что при клонировании кДНК целесообразно осуществлять ее встройку в раннюю область генома SV40 так, чтобы удалялись вирусные сигналы сплайсинга, поскольку в этом случае наблюдается более высокий уровень продукции чужеродного белка.

В первых работах по созданию гибридных вирусов SV40 фрагменты чужеродной ДНК напрямую лигировали с вирусной ДНК и затем вводили в клетки животных. Гибридные вирусные клоны выявляли гибридизацией *in situ*. Такие эксперименты трудоемки и дают невысокий выход клонов гибридных вирусов. Методология получения гибридных ДНК SV40 значительно упростилась после введения промежуточного этапа — клонирования сегментов ДНК в составе бактериальных плазмид. Данную методологию эффективно использовали О. Лауб с соавторами (1983 г.) для клонирования в ранней области генома SV40 гена поверхностного антигена вируса гепатита В (см. 12.5.3). Все промежуточные этапы — встройку гена HBsAg в геном вируса SV40, отбор нужной конструкции гибрида и наработку ДНК для трансфекции — проводили в клетках *E. coli* (рис. 14.7). Затем из гибридной ДНК выщепляли последовательность бактериальной векторной плазмиды, вирусную ДНК циклизовали с помощью ДНК-лигазы и трансфицировали ею клетки COS. Благодаря суперпродукции гибридной мРНК, инициируемой с раннего промотора вируса SV40, наблюдался синтез большого коли-

чества гликозилированного белка HBsAg, который экскретировался из клеток и формировал высокоиммуногенные надмолекулярные частицы. Экспрессия гена HBsAg в сконструированном гибриде была на порядок выше, чем при встройке этого же гена в позднюю область генома вируса SV40.

Р. Бхат с соавторами (1989 г.) описали новый тип недефектного литического вектора замещения на основе SV40. Авторы исходили из того, что вариант вируса SV40 dl2800, у которого между *Xba*I-сайтами делетирован участок интрона Т-антигена длиной 258 пн и нарушен t-антиген (рис. 14.8), размножается на культуре клеток CV-1 с такой же эффективностью, как и вирус дикого типа. Было решено использовать dl2800 для клонирования небольших генов, транскрибируемых РНК-полимеразой III. В состав генома dl2800 встроили фрагмент ДНК размером 359 пн, кодирующий ген супрессорной сериновой тРНК человека, а также фрагмент генома аденовируса Ad5 (231 пн), содержащий ген РНК VAI (см. рис. 14.8). Созданные гибридные вирусы эффективно размножались в культуре клеток CV-1 без вируса-помощника, а клонированные гены, специфичные для РНК-полимеразы III, экспрессировались на позднем этапе развития вируса.

Кроме литических векторов замещения поздней или ранней области генома вируса SV40 существует третий тип векторов, на основе которых можно создавать гибридные вирусы SV40. Векторной частью в них является небольшой фрагмент генома вируса, содержащий репликатор. Гибридная кольцевая ДНК подходящего размера, введенная в клетки с вирусом-помощником дикого типа, может образовывать вирусные частицы. Так, Д. Ганем с сотрудниками (1976 г.) в качестве вектора использовали фрагмент, выделенный из ДНК дефектного вируса SV40 d5. В таком вирусе пять раз повторен сегмент генома SV40 длиной 880 пн, содержащий *ori*. Рестриктаза *Hin*dIII расщепляет ДНК этого вируса на пять идентичных фрагментов. С таким фрагментом ДНК вируса SV40 ковалентно объединяли *Hin*dIII-фрагмент ДНК фага λ, содержащий область гена фагового репрессора. Получаемые кольцевые структуры в присутствии вируса-помощника дикого типа реплицировались в клетках млекопитающих и образовывали дефектные вирусные частицы.

Аналогичные гибридные дефектные вирусы SV40 были получены и в других лабораториях. Однако литические векторы данного типа не нашли распространения при клонировании

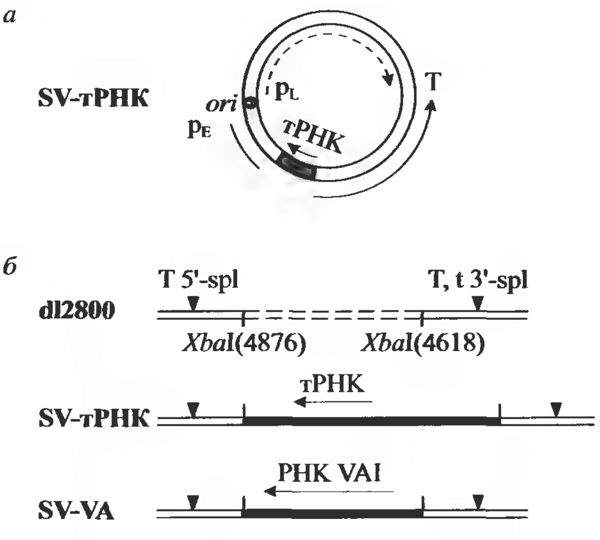


Рис. 14.8. Недефектные литические векторы на основе вируса SV40:

а — структура генома гибрида SV-тРНК; *б* – строение вирусной ДНК в районах делеции (dl2800) и встройки гена супрессорной сериновой тРНК человека (SV-тРНК) или РНК VAI аденовируса Ad5 (SV-VA).
T 5′-spl — 5′-сайт сплайсинга пре-мРНК Т-антигена;
T, t 3′-spl — 3′-сайт сплайсинга пре-мРНК большого и малого т-антигенов

чужеродных генов в клетках животных. Вскоре их вытеснили более удобные в работе аналоги, являющиеся нелитическими эписомными векторами челночного типа.

14.1.3. Нелитические эписомные векторы на основе генетических элементов SV40

Векторы данного типа являются бифункциональными (челночными) плазмидами, способными реплицироваться как в клетках *E. coli*, так и в клетках млекопитающих. В клетках млекопитающих, не поддерживающих их репликацию, плазмиды могут интегрироваться в геном. Поэтому их называют эписомными векторами. Такие плазмиды конструируют встройкой в бактериальную векторную плазмиду целого генома или фрагмента ДНК вируса SV40. Встраиваемый вирусный фрагмент обычно содержит нативный вирусный репликатор, один или два промотора, а также в некоторых случаях — вирусные сигналы сплайсинга и полиаденилирования мРНК (рис. 14.9) В первых экспериментах (1980 г.) по конструированию челночных плазмид на основе pBR322 и генома SV40 выяснилось, что в бактериальной плазмиде имеется последовательность, значительно снижающая уровень экспрессии эукариотических генов. Сначала предположили, что она ингибирует репликацию гибридной ДНК с участка *ori* SV40.

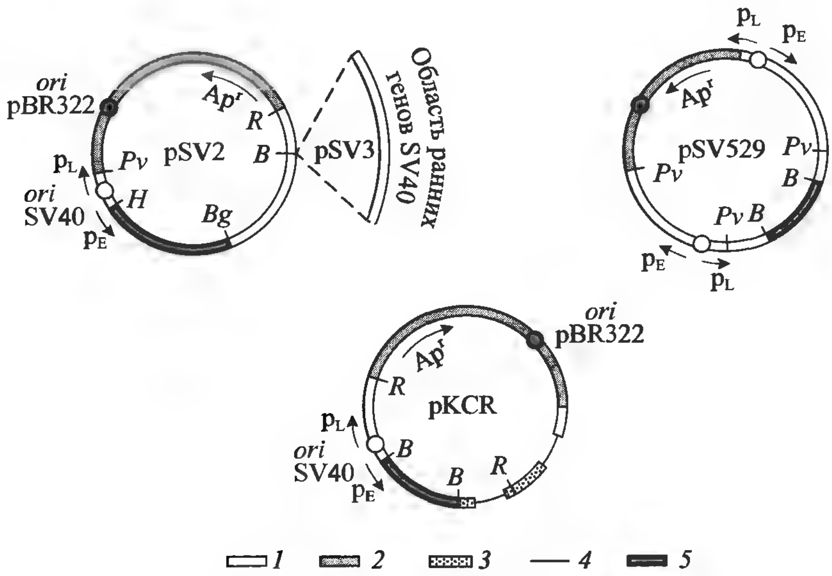


Рис. 14.9. Структура эписомных векторов на основе вируса SV40:

1 — последовательность ДНК вируса SV40, *2* — плазмиды pBR322;
3, *4* — соответственно экзоны и интроны 3′-концевой части гена β-глобина кролика; *5* — клонируемая ДНК.
R — сайт рестрикции *Eco*RI, *B* — *Bam*HI, *Bg* — *Bgl*II, *H* — *Hin*dIII, *Pv* — *Pvu*II

Данная последовательность расположена в pBR322 между точкой гидролиза рестриктазой *Pvu*II и областью начала репликации плазмиды. Делеция этого района приводит к тому, что челночная плазмида pBR-SV40 реплицируется в клетках COS с такой же эффективностью, что и нативная вирусная ДНК, и ее копийность достигает 10^5 молекул на клетку. В дальнейшем Д. Петерсон с соавторами (1987 г.) показали, что эта последовательность pBR322 выполняет роль эукариотического глушителя транскрипции, который действует в *цис*-положении (см. 14.1.1). Поэтому при создании челночных векторов для эукариотической системы данный участок pBR322 целесообразно делетировать.

Благодаря эффективной репликации и транскрипции с сигналов вируса SV40 гибридные плазмиды, конструируемые на основе эписомных векторов с делетированным глушителем транскрипции, обеспечивают в клетках COS высокий уровень продукции чужеродных белков. С использованием векторов данного типа продемонстрирована экспрессия в клетках млекопитающих клонированных генов фибробластного и иммунного интерферонов человека, поверхностного антигена вируса гепатита В, β-глобина кролика, β-галактозидазы *E. coli* и многих других. Подробнее об эписомных векторах см. в 13.3.4.

Преимуществом эписомных векторов перед другими видами векторов на основе генома вируса SV40 является то, что они находятся в клетке в большом количестве копий, не вызывают лизиса клеток и не имеют жестких ограничений на размер чужеродной вставки.

14.1.4. Трансформирующие векторы на основе SV40

Гибридные молекулы ДНК, содержащие неповрежденные ранние гены вируса SV40, можно использовать как трансформирующие векторы. В непермиссивных для вируса SV40 клетках такие молекулы ДНК будут интегрироваться в хромосомы, обусловливая морфологическую трансформацию клеток. Встроенные в вирусную ДНК или челночную плазмиду чужеродные гены также интегрируются в геном клетки во множестве копий. Причем встройка усилителя транскрипции из состава длинного концевого повтора ДНК вируса саркомы мышей Харви в геном гибридного вируса SV40 может увеличивать эффективность морфологической трансформации клеток в 10–20 раз, по-видимому, из-за повышенной продукции т-антигенов.

Трансформирующие векторы на основе SV40 можно использовать для эффективного введения в геном клетки клонированных генов и изучения их экспрессии в интегрированном состоянии. Важным свойством трансформирующих векторов SV40 является то, что интегрированные в геном клетки последовательности могут быть легко извлечены. Показано, что при слиянии трансформированных клеток с клетками, пермиссивными для SV40, происходят исключение гибридной ДНК из хромосомы и ее репликация, приводящие в зависимости от

структуры интегрированной ДНК к образованию исходного вируса или плазмиды.

Как видим, разработанная система векторов на основе генетических элементов вируса SV40 обеспечивает широкие возможности для клонирования и изучения закономерностей экспрессии различных генов в гетерологичном эукариотическом окружении. Реальна перспектива биотехнологического применения данных работ, так как в некоторых случаях можно достигать высокого уровня продукции полноценного полипептида, структурный ген которого клонирован в векторном варианте вируса SV40.

14.1.5. Особенности экспрессии клонированных последовательностей в составе генома SV40

Уже в ранних работах было обнаружено, что уровень экспрессии чужеродных ген-эквивалентов, встроенных в геном SV40, существенно зависит от организации сайтов сплайсинга. Так, Д. Хэмер с соавторами (1979 г.) на примере кДНК β-глобина кролика показали, что если при встройке в поздние гены вируса SV40 нарушаются эндогенные участки сплайсинга, то стабильность синтезируемой гибридной мРНК значительно снижается. Если же встройка не нарушает вирусных сигналов сплайсинга, уровень гибридной РНК высок и наблюдается эффективный синтез чужеродного белка. Также оказалось, что гибридная РНК будет стабильна, когда вирусные сигналы сплайсинга полностью удалены, т. е. синтезируется сразу зрелая форма мРНК. Эти моменты необходимо учитывать при проведении генно-инженерных экспериментов на вирусе SV40.

При конструировании гибридных генов в составе векторов на основе SV40 часто используют вирусные последовательности, содержащие сигналы полиаденилирования мРНК. С. Карсвэл и Дж. Элвин (1989 г.), присоединяя ранние и поздние сигналы полиаденилирования SV40 к ген-эквиваленту бактериальной хлорамфениколацетилтрансферазы, находящемуся под контролем позднего промотора SV40, показали, что гибридная мРНК с поздними сигналами более стабильна и накапливается в клетках в количестве, большем в 5 раз, т. е. сигналы полиаденилирования в поздних генах SV40 функционируют более эффективно, чем в ранних.

Эффективность трансляции чужеродной мРНК может существенно зависеть от структуры ее 5′-конца. Например, Б. Коллен (1988 г.) обнаружил, что клонированная кДНК интерлейкина 2 человека слабо экспрессируется в клетках млекопитающих. После замены некодирующей 5′-концевой части кДНК на гетерологичную лидерную последовательность гена пре-проинсулина II крысы продукция интерлейкина значительно возросла.

Рассмотренные результаты демонстрируют, что для достижения высокого уровня экспрессии чужеродного белка в клетках млекопитающих необходимо тщательно планировать структуру гибридных генов. Учитывая ограниченность наших знаний, целесообразно создавать одновременно несколько вариантов гибридного гена, различающихся организацией сигналов сплайсинга, полиаденилирования, инициации транскрипции и трансляции. Последующий анализ уровня продукции целевого белка позволит выявить оптимальную конструкцию.

Дж. Камонис с соавторами (1990 г.) создали на основе плазмиды pSV2-*cat* вектор, способный реплицироваться не только в бактерии *E. coli* и культуре клеток млекопитающих, но и в клетках дрожжей *S. cerevisiae* (рис. 14.10). Оказалось, что последовательности, встраиваемые в pCYMO вместо гена *cat*, могут экспрессироваться с раннего промотора вируса SV40 и в клетках животных, и в дрожжах. Это позво-

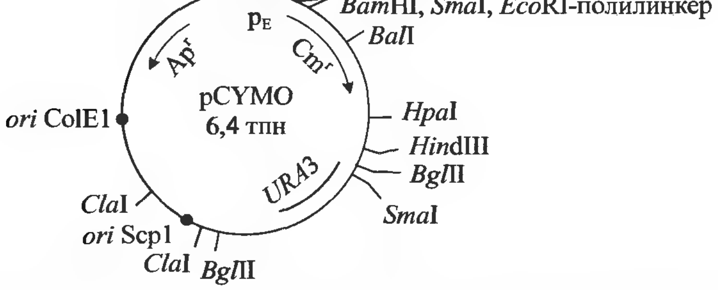


Рис. 14.10. Векторная плазмида pCYMO, содержащая репликоны плазмиды ColE1, вируса SV40 и дрожжевой плазмиды Scp1

ляет изучать синтез и процессинг белков одновременно в системах низшего и высшего эукариотических организмов.

Вирус SV40 имеет ограниченный круг пермиссивных культур клеток, на которых он способен продуктивно размножаться. Поэтому внимание исследователей привлечено и к другим полиомавирусам. Расширение спектра вирусов, применяемых для создания векторных ДНК, представляет несомненный интерес, так как увеличивает экспериментальные возможности при введении чужеродных генов в различные клетки животных и изучении их экспрессии. Наибольшие успехи достигнуты на вирусе полиомы мышей (Ру) и вирусе ВК человека (BKV). Вирус полиомы размножается на различных линиях культур клеток мышей, а BKV — на культуре клеток человека. По организации генома данные полиомавирусы во многом схожи с SV40. Поэтому при конструировании векторных и гибридных вариантов вирусов Ру и BKV используют богатый опыт, накопленный на SV40.

Показана возможность клонирования и экспрессии чужеродных генов в составе литических или эписомных векторов на основе вирусов Ру и BKV. Для вируса полиомы по аналогии с линией клеток COS создана культура клеток COP8, продуцирующая Т-антиген Ру и поддерживающая репликацию векторов с делецией ранних (и при необходимости поздних) генов вируса.

Имеющиеся молекулярные векторы на основе элементов генома разных полиомавирусов позволяют изучать особенности регуляции функционирования различных генов в широком спектре культур клеток млекопитающих.

14.2. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ ГЕНОМА ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ БЫКА

При введении клонированных генов в клетки млекопитающих в процессе генетической трансформации множественные копии этих генов интегрируются в геном клетки. У независимо отобранных трансформированных клеток места интеграции чужеродной ДНК в хромосомы различаются. Это может приводить к тому, что уровень экспрессии введенных генов в разных клонах будет варьировать за счет влияния прилегающих участков хромосом (эффект положения гена). Одна из возможностей преодолеть данные затруднения возникла в 1981 г. после создания векторов на основе ДНК вируса папилломы быка типа 1 (BPV-1).

В конце 1970-х гг. было обнаружено, что ряд вирусов рода *Papillomavirus* семейства Papillomaviridae, вызывающих образование фибропапиллом у своих природных хозяев, онкогенны для хомяков, а вирус папилломы быка способен обусловливать морфологическую трансформацию культур клеток мышей, крыс и хомяков. Причем клетки, трансформированные BPV-1, содержат в ядре до 200–300 копий двухцепочечной кольцевой вирусной ДНК во внехромосомном состоянии, и для установления и поддержания трансформированного состояния клеток не требуется интеграции вирусного генома в хромосомную ДНК. Более того, в трансформированных клетках BPV-1 персистирует исключительно в виде кольцевой ДНК и вирусные частицы не образуются. Эта особенность биологии BPV-1 обусловила повышенный интерес к нему как к потенциальному вектору для молекулярного клонирования в клетках млекопитающих.

В 1982 г. Ф. Чен с соавторами определили полную последовательность 7946 пн кольцевой двухцепочечной молекулы ДНК вируса BPV-1. Анализ этой последовательности позволил выявить восемь открытых рамок трансляции в области ранних и две — в области поздних генов (рис. 14.11). Между концом ОРТ *L1* и началом ОРТ *E6* расположена протяженная некодирующая область. Эта область играет большую роль в контроле экспрессии вирусных генов и поэтому обозначается LCR (от англ. long control region). В ней расположен ряд промоторов, а также *цис*-действующие вирусспецифичные усилители транскрипции.

В отличие от вирусов рода *Polyomavirus* у BPV-1 транскрипция ранних и поздних генов происходит с одной цепи вирусной ДНК и направлена в одну сторону. Идентифицированы промоторы в положениях 89, 890, 2443, 3080, 7185, 7250, 7940 пн. В результате альтернативного сплайсинга образуется большой набор зрелых мРНК размером 1–4 тыс. нуклеотидов (рис. 14.12).

Промотор p_{7940} активируется полным продуктом гена *E2*, имеющим размер 48 кДа, через взаимодействие его с усилителем транскрипции, расположенным в LCR. С промотора p_{3080} транскрибируется мРНК, детерминирующая укороченный продукт E2-TR, имеющий размер

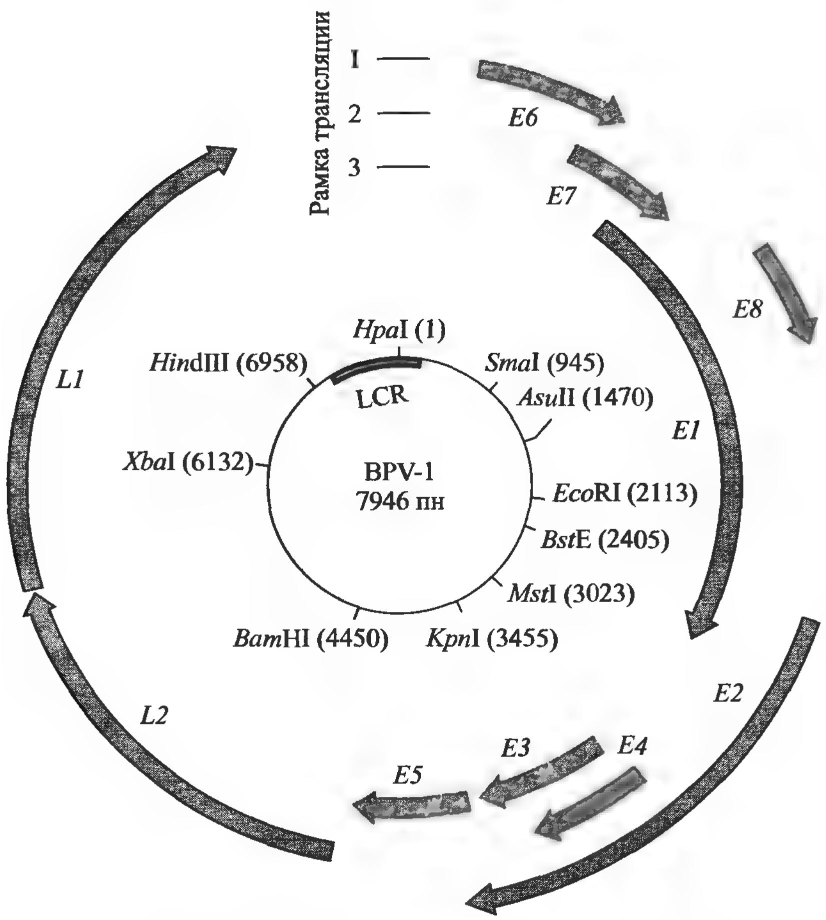


Рис. 14.11. Карта генома вируса папилломы быка типа 1.

В скобках указано положение сайтов рестрикции (пн).

LCR — некодирующая область, контролирующая в *цис*-положении транскрипцию вирусных генов

31 кДа. Данный белок специфически репрессирует активацию транскрипции с p_{7940} полноразмерным белком E2. Другим репрессором является «гибридный» белок E8/E2 размером 28 кДа, мРНК которого транскрибируется с промотора p_{890}. Соотношение белков E2 : E2-TR : E8/E2 в клетке соответствует 1 : 10 : 3. Такое высокое содержание репрессоров активации транскрипции с промотора p_{7940}, по-видимому, обусловливает низкий уровень вирусспецифичных молекул РНК в клетках, трансформированных BPV-1.

Поздний промотор MPL (положение 7250) является единственным «бородавкаспецифичным» промотором. Транскрипция с него инициируется лишь в дифференцированных кератиноцитах фибропапилломы. И только в этих клетках синтезируются капсидные белки BPV-1 и происходит формирование вирусных частиц. Эффективность транскрипции с MPL в 10–100 раз выше, чем с других промоторов вируса. Интересной особенностью поздней транскрипции BPV-1 является то, что в наибольшем количестве образуется мРНК белка E4, который не входит в состав вириона. Полагают, что он важен для сборки вирусных частиц.

Уровень синтеза белков BPV-1 в культурах клеток очень низок, поэтому их свойства изучать довольно сложно. Тем не менее для большинства этих белков основные функции известны:

E1, E7	Поддержание плазмидного состояния вирусной ДНК
E2	Транскрипционный модулятор вирусных промоторов
E4	Созревание вирионов
E5, E6	Морфологическая трансформация клеток
L1	Основной капсидный белок
L2	Минорный капсидный белок

Кольцевая ДНК BPV-1 содержит единственные места гидролиза рестриктазами *Bam*HI, *Hin*dIII и *Eco*RI (см. рис. 14.11). Причем сайт *Eco*RI находится в трансформирующей области, а сайты *Hin*dIII и *Bam*HI — вне ее. Большой *Bam*HI–*Hin*dIII-фрагмент ДНК вируса BPV-1, содержащий 69 % генома (BPV69T), несет функции, необходимые для автономной репли-

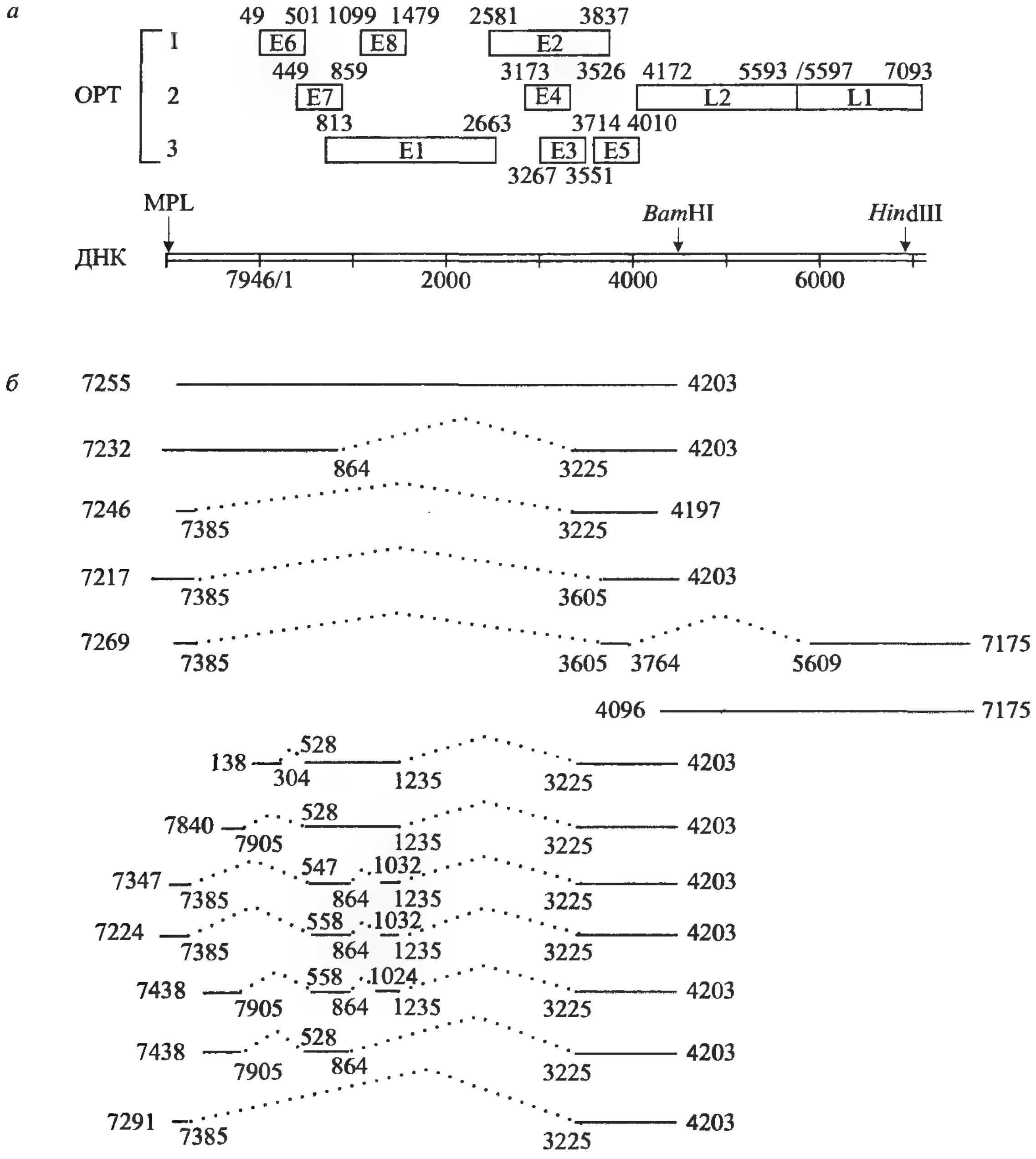


Рис. 14.12. Генетическая карта (*а*) и схема сплайсинга молекул матричных РНК BPV-1 (*б*).

ОРТ в фазах 1, 2 и 3 обозначены прямоугольниками. Цифрами указаны координаты соответствующих ОРТ на нуклеотидной последовательности вирусной ДНК (*а*). Сплошными линиями обозначены зрелые формы мРНК, пунктиром — области интронов. Цифрами обозначены координаты сплайсинга соответствующих мРНК (*б*). MPL — основной поздний промотор

кации и трансформации клеток, хотя трансформирующая активность его ниже, чем полной вирусной ДНК.

Н. Сэрвер с соавторами (1981 г.) использовали фрагмент BPV69T в качестве вектора для переноса гена пре-проинсулина крысы (rI_1) в клетки мыши. Клоны клеток, трансформированных гибридной ДНК BPV69T–rI_1 селектировали по онкогенно трансформированному фенотипу и анализировали в них экспрессию гена rI_1. Гибридная ДНК сохранялась в клетках в плазмидном состоянии, и ген rI_1 эффективно транскрибировался и транслировался в проинсулин.

По аналогичной схеме К. Зин с соавторами (1982 г.) клонировали хромосомный ген фибробластного интерферона человека. Гибридная ДНК BPV69T-*IFN* находилась в автономном состоянии, и ее копийность составляла 30–60 молекул на клетку. После индукции с помощью поли(I)·поли(C) в трансформированных клетках мыши наблюдался высокий уровень транскрипции гена интерферона человека. Данные исследования доказали возможность ис-

пользования ДНК вируса папилломы быка в качестве внехромосомного многокопийного молекулярного вектора клеток млекопитающих.

Кроме высокой копийности векторы такого типа обеспечивают одинаковое генетическое окружение клонированного гена во всех отобранных клонах трансформантов. Это позволяет преодолеть эффект положения, возникающий при интеграции чужеродного гена в хромосомы клетки. Важной особенностью является то, что векторы на основе BPV-1 относятся к нелитическим векторам, и поэтому трансформированные культуры могут сохранять гибридные молекулы ДНК во внехромосомном состоянии в течение многих циклов деления.

Для упрощения генно-инженерных манипуляций были созданы челночные векторы на основе ДНК вируса папилломы и плазмид. Такие векторы способны эффективно реплицироваться и сохраняться как в клетках млекопитающих, так и в бактериях. В первых подобных работах полную копию ДНК вируса BPV-1 или BPV69T-фрагмент объединяли с плазмидой pBR322. В обоих случаях трансформирующая активность гибридных ДНК была снижена более чем в 100 раз по сравнению с исходной ДНК вируса. Выщепление из гибридной ДНК с помощью рестриктаз последовательности pBR322 приводило к восстановлению трансформирующей активности вирусной ДНК. Это позволило предположить, что тот же участок плазмиды pBR322, который подавляет в *цис*-положении репликацию ДНК вируса SV40 (см. 14.1.3), ингибирует репликацию ДНК вируса папилломы быка. Поэтому для получения челночных векторов полную копию ДНК вируса BPV-1, расщепленную рестриктазой *Bam*HI, соединяли с делеционными производными плазмиды pBR322 типа pML2, у которых удален участок ингибирования репликации (глушитель транскрипции) вирусных ДНК. Такие гибридные ДНК эффективно трансформировали клетки мыши, реплицировались в них как стабильные, неинтегрированные, многокопийные (до 100 копий на клетку) плазмиды.

Сконструированные челночные плазмиды использовали для клонирования генов и изучения их экспрессии в клетках млекопитающих. Например, Д. Димайо с соавторами (1982 г.) при клонировании в векторной плазмиде pBPV-H11 хромосомного гена β-глобина человека продемонстрировали, что этот ген эффективно транскрибируется с собственного промотора. Причем мРНК β-глобина подвергалась правильному процессингу. Клонированный в pBPV-H11 фрагмент ДНК с геном β-глобина обусловливал увеличение эффективности трансформации клеток мыши гибридной ДНК примерно в 500 раз по сравнению с исходной pBPV-H11. Возможно, в этом хромосомном фрагменте величиной 7,7 тпн оказался усилитель транскрипции или репликатор ДНК.

Дж. Сэмбрук с соавторами (1985 г.) после встройки кДНК вируса гриппа в экспрессирующий челночный вектор BPV-1 получили в клетках мыши синтез гемагглютинина этого вируса. Поместив в такой вектор кДНК активатора тканевого плазминогена человека (t-PA), наблюдали эффективную секрецию из клеток мыши в культуральную среду ферментативно активного t-PA (1986 г.).

Аналогично Н. Сэрвер с соавторами (1985 г.), встроив кДНК γ-интерферона человека в экспрессирующий челночный вектор, созданный на основе BPV-1, pML2 и промотора гена металлотионеина, добились высокого уровня продукции иммунного интерферона человека в культуре клеток мыши C127. При этом было обнаружено, что независимо выделенные клоны трансформантов могут значительно различаться по уровню продукции чужеродного белка. Скорее всего, это было связано с индивидуальными различиями клеток в культуре.

Используя тот же вектор, авторы изучили (1987 г.) экспрессию ген-эквивалента фактора VIII (FVIII) крови человека. Данный фактор играет важную роль в многоступенчатом процессе коагуляции крови, а его нехватка или изменение структуры приводят к развитию гемофилии А. Секретируемая форма FVIII имеет большой размер (2332 АК). Она подвергается ряду активирующих протеолитических расщеплений, в результате которых, в частности, удаляется внутренний В-домен (949 АК). После этого FVIII представляет собой комплекс из двух субъединиц: N-концевой (90 кДа) и С-концевой (73 кДа). После расщепления субъединицы 90 кДа формируется полностью активный FVIII, состоящий из трех нековалентно ассоциированных субъединиц 50, 43 и 73 кДа. При попытке экспрессировать полную копию кДНК прополипептида FVIII авторы обнаружили, что синтезируемый крупный белок нарушает метаболизм культивируемых клеток и уровень его продукции в результате очень низок. Делетировав основную часть последовательности, кодирующей В-домен, удалось значительно повысить продукцию целевого белка FVIII. Оказалось, что эффективно синтезируемая форма фактора крови VIII проявляет все физические и биологические свойства нормального FVIII.

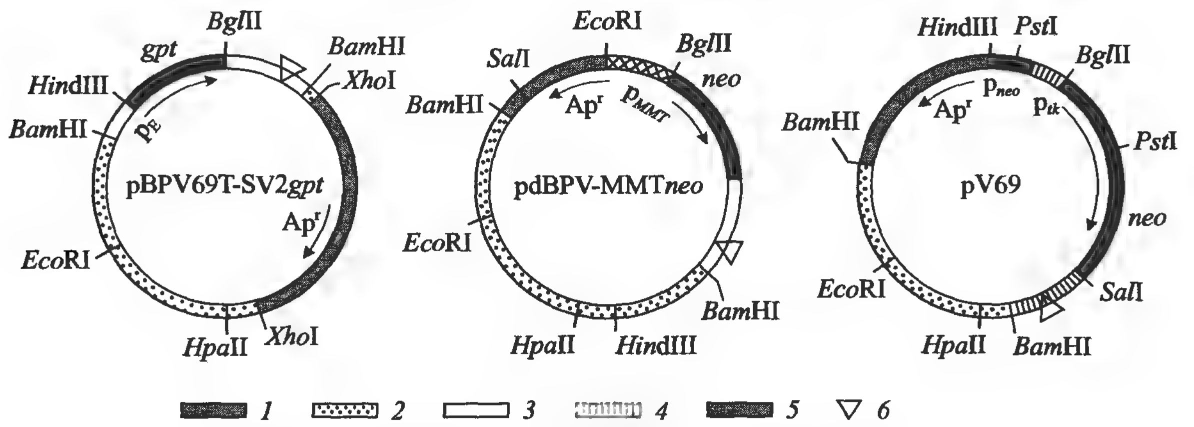


Рис. 14.13. Челночные векторные плазмиды на основе ДНК вируса папилломы быка:

1 — последовательность ДНК pBR322 или pML, *2* — BPV-1, *3* — SV40; *4* — ген тимидинкиназы HSV-1; *5* — доминантный селективный маркер; *6* — участки полиаденилирования.
p_E — промотор ранней транскрипции SV40, p_{MMT} — гена металлотиоиеина мыши,
p_{neo} — бактериального гена *neo*, p_{tk} — гена *tk* HSV-1

Нелитическую векторную систему на основе BPV-1 использовали Б. Конвэй с соавторами (1989 г.) для создания линии клеток — продуцентов потенциальной белковой (субъединичной) вакцины против вируса Эпштейна–Барр (EBV). Иммунодоминантными антигенами EBV являются основные гликопротеины оболочки вириона gp340 и gp220. Эти два белка кодируются одним геном, а матричные РНК для них формируются в процессе альтернативного сплайсинга общей пре-мРНК. Структурный ген gp340/220 встроили в BPV-вектор под контроль промотора гена металлотионеина мыши. Трансформированные гибридной ДНК клетки продуцировали полноценные гликопротеины EBV, которые экспонировались на поверхности клеток благодаря наличию на С-конце гидрофобного якоря, обеспечивающего фиксацию их в мембранах. Клоны клеток, продуцирующих gp340/220, оказались относительно нестабильными, и после 50 клеточных делений способность синтезировать гликопротеины EBV практически утрачивалась. Авторы удалили из гена последовательность, кодирующую С-концевой гидрофобный якорь. Это привело к тому, что укороченный gp340/220 эффективно секретировался в культуральную среду, в результате чего не оказывал негативного воздействия на продуцирующую его клетку. Полученные на основе такого варианта культуры с высокой эффективностью и стабильно (даже после 50 циклов деления) продуцировали внеклеточный gp340/220 вируса Эпштейна–Барр.

Следует отметить, что гибридные молекулы ДНК, созданные на основе челночных векторов BPV-1, вследствие их внехромосомной локализации можно легко перенести из клеток животных в бактерии путем трансформации компетентных клеток *E. coli* суммарным препаратом ДНК трансформированных BPV-1 культур клеток. Это позволяет достаточно просто проводить структурный анализ гибридных плазмид после репликации их в эукариотических клетках.

Одним из ограничений рассмотренной векторной системы следует признать то, что селективным маркером является фенотип онкогенно трансформированных клеток. Только линии клеток, чувствительные к трансформации, обусловливаемой вирусом папилломы быка, являются подходящими реципиентами для сегментов чужеродной ДНК, объединенных с трансформирующей областью BPV-1. Соединение доминантных селективных маркеров с ДНК вируса папилломы позволяет расширить круг хозяев для этой векторной системы.

Чтобы изучить возможность использования таких векторов, М. Лоу с соавторами (1982 г.) сконструировали гибридную ДНК, которая включала фрагмент BPV69T, сегмент плазмиды pSV2-*gpt*, содержащий ген ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы *E. coli*, соединенный с ранним промотором вируса SV40, и фрагмент плазмиды pBR322 (рис. 14.13). Полученной гибридной ДНК pBPV69T-SV2*gpt* трансформировали клетки мыши и отбор трансформантов проводили либо на HAT-среде, содержащей ксантин и микофеноловую кислоту (см. 13.3.1), либо на среде, позволяющей выявлять клоны морфологических трансформантов. Отобранные клоны проверяли затем на наличие второго маркера. В подавляющем большинстве случаев выявляли сразу оба маркера.

В той же лаборатории в 1983 г. была сконструирована плазмида на основе pL12, в которую

встроили полный геном вируса папилломы BPV-1 и гибридный ген, состоящий из промотора гена металлотионеина мыши, кодирующей последовательности гена *neo* неомицин-фосфотрансферазы и 3′-концевой последовательности гена t-антигена вируса SV40, включающей сигналы сплайсинга и полиаденилирования мРНК (см. рис. 14.13). При введении в клетки мыши плазмида pdBPV-MMT*neo* сохранялась как стабильный внехромосомный элемент (20–100 копий на диплоидный геном клетки). Отбор трансформантов можно было осуществлять как по устойчивости к G-418, так и по фенотипу морфологической трансформации. Г. Пэвлакис и Д. Хэмер (1983 г.) создали вектор на основе BPV-1, pBR322 и гена металлотионеина мыши. Данный вектор BPV-MT детерминировал в трансформированных клетках суперпродукцию металлотионеина, который связывал избыток токсичных катионов Cd^{2+}. Такой доминантный селективный маркер позволял просто и надежно отбирать клоны клеток, содержащих гибридные молекулы ДНК на основе BPV-MT.

Челночная плазмида pV69 (см. рис. 14.13) была получена Г. Менегази с соавторами (1984 г.). В состав pV69 входят: фрагмент BPV69T, сегмент pBR322 и гибридный ген *vv2*, состоящий из тандемно расположенных промоторов генов *neo* и тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-1), состыкованных с кодирующей последовательностью гена *neo*. Последняя в свою очередь на 3′-конце граничит с фрагментом ДНК вируса герпеса, содержащим сигналы полиаденилирования мРНК гена *tk* вируса HSV-1. Плазмида pV69 индуцирует в *E. coli* устойчивость к неомицину, несмотря на наличие промотора *tk* между бактериальным промотором и кодирующей последовательностью гена неомицин-фосфотрансферазы. Созданный доминантный селективный ген *vv2* экспрессируется также и в эукариотических клетках.

При введении в клетки мыши плазмид pdBPV-MMT*neo* или pV69 и селекции трансформантов по устойчивости к антибиотику G-418 первоначально не удается выявить морфологически трансформированные клетки. Лишь при последующих пересевах отобранные клоны клеток приобретают типичное для онкогенной трансформации состояние. Такие векторы могут быть полезны для изучения функционирования клонированных генов, экспрессия которых невозможна в трансформированных клетках.

Следует отметить, что экспрессирующие векторы на основе BPV-1, несущие доминантные селективные маркеры, можно ввести в самые разные культуры клеток млекопитающих и отобрать трансформанты по проявлению этих биохимических маркеров. В клетках, не поддерживающих эписомное состояние генома BPV-1, гибридные молекулы ДНК интегрируются в хромосомы.

Важное свойство векторов на основе BPV-1 состоит в том, что они практически являются плазмидами морфологически трансформируемых ими эукариотических клеток и в их составе можно клонировать крупные фрагменты ДНК. В целом использование вируса папилломы быка в качестве молекулярного вектора, несомненно, полезно и дополняет систему клонирования и изучения функционирования генов в различных клетках млекопитающих.

14.3. АДЕНОВИРУСЫ В КАЧЕСТВЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЕКТОРОВ

14.3.1. Молекулярно-генетическая организация Ad2 и Ad5 человека

Аденовирусы принадлежат к семейству Adenoviridae, которое делится на два рода: *Mastadenovirus* (обнаружены у млекопитающих, включая человека) и *Aviadenovirus* (инфицируют только птиц). В настоящее время известно большое число аденовирусов, выделенных от различных животных. Только для аденовирусов человека идентифицировано более 50 серотипов, среди которых выделяют 7 подгрупп, различающихся по содержанию GC-пар в ДНК и способности вирусов вызывать агглютинацию эритроцитов. Аденовирусы обладают широким спектром тканевого тропизма и могут вызывать заболевания респираторной и центральной нервной систем, желудочно-кишечного тракта и мочеполовых путей, глазные болезни.

Лучше всего изучены аденовирусы человека типов 2 и 5 (Ad2 и Ad5). Эти вирусы очень похожи и имеют гомологию по последовательности ДНК около 99 %, что обусловливает их эффективную рекомбинацию между собой. Аденовирусы характеризуются узким кругом хозяев. Они интенсивно размножаются только в организме или культуре клеток естественного хозяина. В чужеродной системе аденовирусы иногда могут реплицироваться, но очень слабо. Ad2 и Ad5 удается легко наработать в больших количествах в суспензионной культуре клеток человека HeLa.

Аденовирусный вирион представлен икосаэдрическим белковым капсидом (70–100 нм

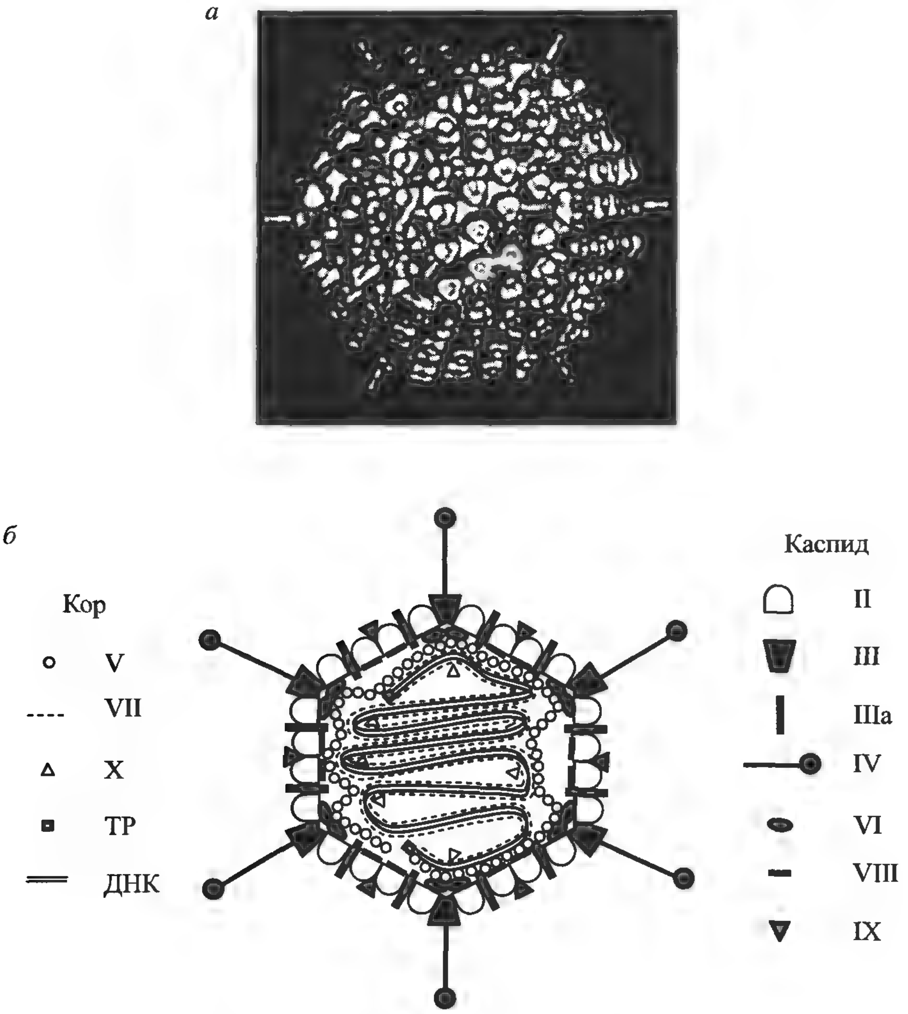


Рис. 14.14. Вирион аденовируса:

а — трехмерная модель, *б* — схематичное изображение вириона.
Римскими цифрами обозначены полипептиды; TP — терминальный белок

в диаметре), в вершинах которого находятся структуры, называемые шипами. В капсид упакована геномсодержащая сердцевина, или кор (от англ. core). Всего вирион Ad2/Ad5 включает 11 структурных белков: 4 из них входят в состав кора, а 7 других формируют капсид (рис. 14.14).

Геном данных вирусов представляет собой линейную двухцепочечную молекулу ДНК размером около 36 тпн, на концах которой находятся небольшие (102 и 103 пн для Ad2 и Ad5 соответственно) инвертированные повторяющиеся последовательности — ITR (от англ. inverted terminal repeats). Аденовирусный геном кроме структурных (вирионных) белков кодирует не менее 15 неструктурных белков. Для молекулы ДНК Ad2 к 1987 г. расшифрована полная последовательность нуклеотидов (35 937 пн).

ДНК аденовирусов инфекционна, однако ее удельная инфекционность крайне низка. Если препарат ДНК выделяется из вирионов без обработки проназой, то обнаруживается белок, ковалентно связанный с 5′-концами цепей молекулы вирусной ДНК. Данный белок обозначают TP (от англ. terminal protein). Инфекционность у аденовирусной ДНК, содержащей TP, значительно выше, чем у полностью депротеинизированной ДНК.

Ad2 и Ad5 хорошо изучены генетически и биохимически. Именно у аденовирусов впервые был обнаружен сплайсинг эукариотических матричных РНК (1977 г.). Достаточно хорошо изучено функционирование генома на уровне транскрипции (рис. 14.15). На раннем этапе после инфицирования клетки с молекулы вирусной ДНК считывается не менее шести транскрипционных единиц (*E1a*, *E1b*, *E2a*, *E2b*, *E3*, *E4*). Каждая из этих единиц кодирует набор разных мРНК, которые образуются из нее в процессе альтернативного сплайсинга. На позднем этапе цикла развития вирус продуцирует множество разнообразных молекул мРНК, большинство которых происходит из единой транскрипционной едини-

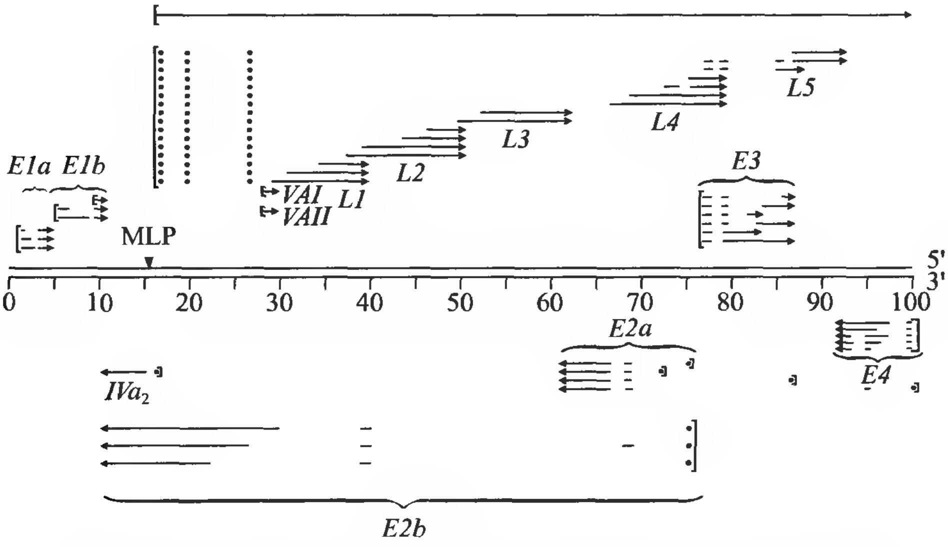


Рис. 14.15. Транскрипционная карта генома аденовирусов Ad2 и Ad5.

Точка начала транскрипции каждой мРНК обозначена вертикальной квадратной скобкой. Горизонтальными стрелками с разрывами обозначены экзоны, из которых составлены соответствующие зрелые молекулы РНК

цы, охватывающей значительную часть генома аденовируса (от 16,4 до 99 ед. карты). Синтез этой молекулы-предшественника инициируется с сильного, так называемого основного позднего промотора MLP (от англ. major late promoter). Молекулы мРНК, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга первичного позднего транскрипта, принято объединять в 5 групп (от *L1* до *L5*; см. рис. 14.15). Интересно, что все эти мРНК имеют одинаковые 5′-концевые последовательности, состоящие из некодирующих трех сегментов исходного транскрипта.

Продукты гена *E1a* стимулируют активность пяти промоторов на раннем этапе цикла развития аденовируса. В свою очередь белок E1b активирует транскрипцию с промотора гена *E1a*. Показано, что для эффективного развития вируса необходимы продукты обоих генов — *E1a* и *E1b*.

E2a кодирует белок DBP (от англ. DNA binding protein) с молекулярной массой 72 кДа, связывающийся с одноцепочечной ДНК. *E2b* детерминирует два основных полипептида: предшественник концевого белка pTP (от англ. precursor of terminal protein) размером 80 кДа и ДНК-полимеразу Pol размером 140 кДа.

Ген *E3* кодирует белки, обеспечивающие молекулярную мимикрию Ad2 при заражении организма-хозяина (человека). Данные белки взаимодействуют внутри инфицированной клетки с предшественниками антигенов главного комплекса гистосовместимости (MHC) класса I и предотвращают их транспорт из цитоплазмы на поверхность клетки. Наличие в достаточном количестве антигенов MHC на поверхности клетки является обязательным условием для представления иммунной системе организма вирусспецифичных антигенов, находящихся в составе плазматической мембраны инфицированной клетки. Такие клетки узнаются как чужие, атакуются и лизируются иммунокомпетентными клетками. Обусловленное продуктами гена *E3* снижение концентрации антигенов MHC на поверхности инфицированной клетки уменьшает возможность узнавания ее специфичными цитотоксическими Т-лимфоцитами и позволяет вирусу частично «ускользать» от атак иммунной системы зараженного организма.

Для развития в культуре клеток ген *E3* не обязателен. Это доказано с помощью различных мутантов по области 79–86 ед. карты генома Ad2 и Ad5.

Ген *E4*, как *E1* и *E2*, жизненно важен и кодирует ряд полипептидов, функция которых пока до конца не выяснена.

На поздней стадии цикла развития аденовирусы блокируют синтез белков клетки и направляют синтез огромного количества белковых продуктов своих поздних генов, бóльшая часть которых являются структурными белками вирионов. Сборка вирионов происходит в ядре клетки. Продуктивная инфекция аденовирусами заканчивается лизисом клеток.

Репликация линейной двухцепочечной молекулы ДНК аденовирусов происходит в ядре клетки и инициируется с обоих концов. Области начала репликации расположены в коротких инвертированных повторах, и для инициации

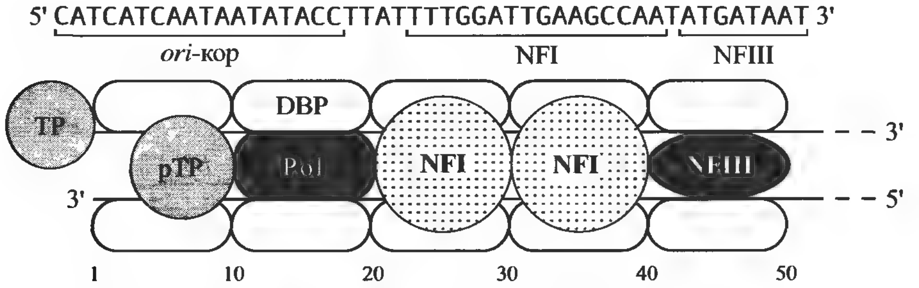


Рис.14.16. Схема ДНК-белкового и белок-белкового взаимодействия в области инициации репликации ДНК аденовируса.

Приведена последовательность цепи ДНК, связанной ковалентно с белком ТР. Квадратными скобками обозначены домены ДНК, с которыми связываются соответствующие белки

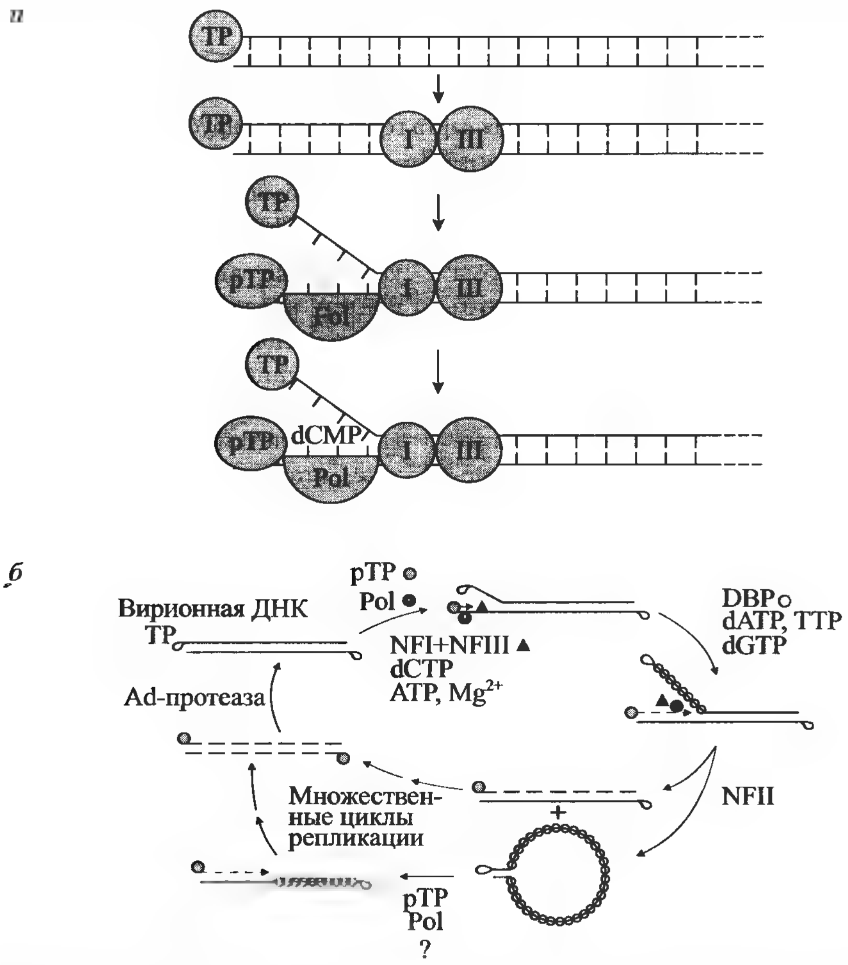


Рис. 14.17. Модель инициации (*а*) и механизма репликации ДНК аденовируса (*б*).

I — NFI, III — NFIII

репликации требуется ряд специфичных актов ДНК-белкового и белок-белкового взаимодействия. Выявлены три основных домена, расположенных в концевом участке длиной 51 пн (рис. 14.16) и необходимых для эффективной репликации вирусной ДНК. Оказалось, что наряду с вирусными белками pTP, Pol, DBP для репликации требуются клеточные белковые факторы, специфично связывающиеся с последовательностями ДНК: NFI и NFIII (от англ. nuclear factor), а также NFII — клеточная топоизомераза.

Аденовирусы реализуют уникальный процесс инициации репликации ДНК, известный как ***белковое праймирование***. Вирусный белок pTP ковалентно соединяется с дезоксицитозинмонофосфатом, чья 3′-гидроксильная группа выступает в качестве праймера для последующего наращивания цепи, комплементарной считываемой цепи реплицируемой ДНК. Синтез

ДНК осуществляется по механизму вытеснения цепи (рис. 14.17). После завершения процесса репликации молекулы белка pTP остаются ковалентно связанными с концами ДНК, но подвергаются протеолитическому процессингу, в результате чего их масса с 80 кДа уменьшается до 55 кДа, и эта форма обозначается TP.

Упаковка вирусного генома в вирионы происходит слева направо по отношению к принятой карте генома (см. рис. 14.15) и зависит от специфичной *цис*-действующей последовательности аденовирусной ДНК. Данный домен упаковки (packaging domain) картирован в положении 194–358 пн от левого конца генома Ad5, и в его состав входят пять повторяющихся сегментов с усредненной последовательностью $5'\left(\frac{A}{T}\right)AN\left(\frac{A}{T}\right)TTTG\ 3'$. Делеция домена упаковки приводит к утрате жизнеспособности вируса.

При инфицировании культуры клеток почки мартышки (непермиссивных для Ad, но пермиссивных для SV40) аденовирусами человека совместно с SV40 удается выделять рекомбинантные аденовирусы, приобретшие способность размножаться в данных клетках. Выяснилось, что недефектные рекомбинантные аденовирусы в этом случае содержат в несущественном районе своего генома (79–86 ед. карты) фрагменты ДНК вируса SV40 из области ранних генов. При этом функцию помощника, обеспечивающего рост аденовируса в клетках мартышки, выполняет С-концевая последовательность Т-антигена вируса SV40. Это свойство Т-антигена SV40 было использовано в первых работах по генно-инженерной реконструкции генома аденовирусов.

14.3.2. Конструирование гибридных аденовирусов

Относительно небольшой размер, хорошая изученность организации и функционирования генома аденовирусов, наличие ограниченного числа участков гидролиза различными рестриктазами на вирусной ДНК и высокая гомология ДНК Ad2 и Ad5 позволили успешно осуществить первую серию экспериментов по встройке *in vitro* в геном аденовирусов чужеродных фрагментов ДНК и отбору гибридных вирусов. Эти работы заложили основу генно-инженерной методологии создания аденовирусов, экспрессирующих чужеродные гены.

Для репликации и упаковки аденовирусной ДНК в вирион в *цис*-положении необходимы лишь небольшие последовательности на обоих концах, содержащие области начала репликации, и последовательность, специфичная для упаковки ДНК. Поэтому почти весь вирусный геном можно заместить чужеродной ДНК, выращивая гибрид в присутствии вируса-помощника.

Относительно высокий уровень трансфекции полностью депротеинизированной ДНК Ad2 и Ad5 достигается в клетках линии 293, которую получили Ф. Грэхем с соавторами (1977 г.) в результате трансформации клеток почки эмбриона человека фрагментом ДНК Ad5. В клетках 293 происходит конститутивный синтез полипептидов, кодируемых генами *E1a* и *E1b* аденовируса. Наличие в клетках определенной концентрации этих вирусных белков обусловливает повышенный уровень инфекционности ДНК аденовирусов. Трансфекцию молекулами ДНК аденовирусов человека обычно проводят именно на данной линии культивируемых клеток или ее производных.

В первых исследованиях, посвященных созданию векторной системы аденовирусов и изучению возможности клонировать с ее помощью чужеродные гены, использовали кодирующую последовательность гена *A* вируса SV40 (ген Т-антигена). Это обусловлено тем, что из всех чужеродных генов в составе генома аденовируса наиболее просто можно выявить экспрессируемый ген *A* вируса SV40, так как имеется метод прямого фенотипического отбора аденовирусов, содержащих этот ген. Г. Фэй с соавторами (1979 г.) показали, что на культуре клеток мартышки способны расти только гибридные аденовирусы, синтезирующие Т-антиген SV40 (или его С-концевую часть).

К. Тумель с соавторами (1981–1982 гг.) в качестве векторов использовали ДНК рекомбинантных вирусов Ad2/Ad5, обозначенных 1×51i и 4×225b (рис. 14.18, *а*). На ДНК каждого из этих вариантов аденовирусов имеется по два участка гидролиза рестриктазой *Bam*HI. ДНК векторных вирусов гидролизовали рестриктазой *Bam*HI и добавляли к этим препаратам *Bgl*I–*Bam*HI-фрагмент ДНК вируса SV40 (содержит кодирующие последовательности Т- и t-антигенов, но без промотора), у которого *Bgl*I-конец был заменен с помощью линкера на *Bam*HI-конец. После обработки ДНК-лигазой добавляли ДНК исходного аденовируса и такой смесью трансфицировали клетки линии 293. Полученное вирусное потомство дважды пассировали на клетках африканской зеленой мартышки CV-1. При этом в клетках CV-1 размножалась лишь смесь гибридных дефектных аденовирусов и исходного аденовируса. Последний комплементи-

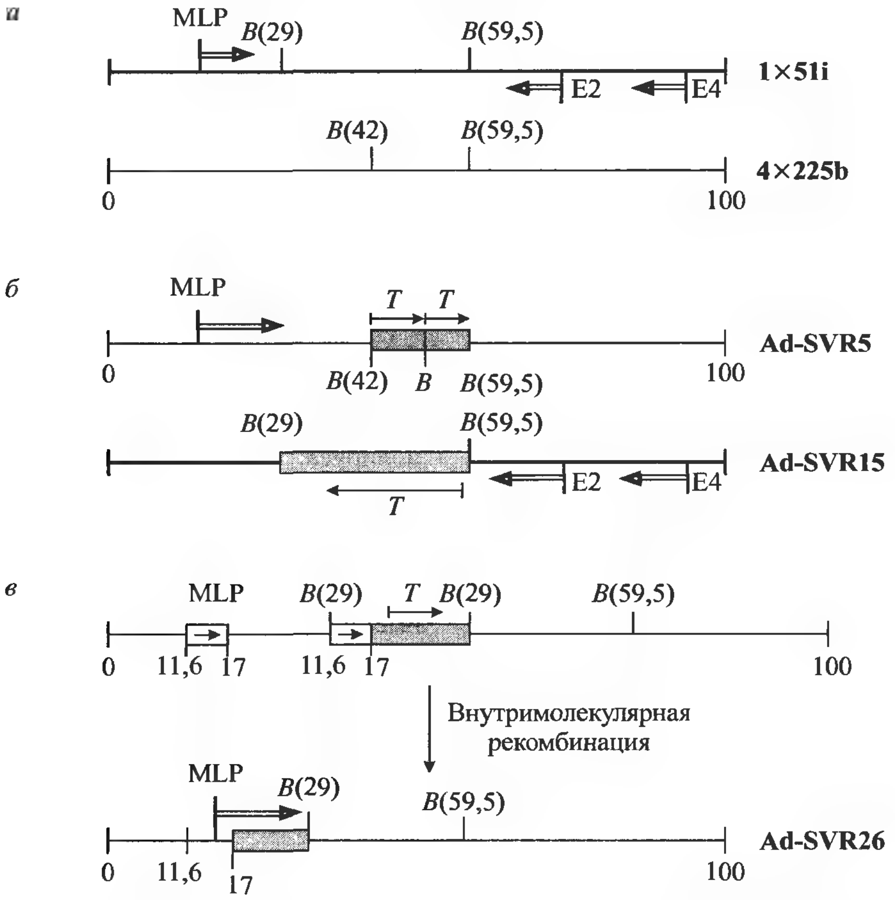


Рис. 14.18. Схема геномов векторных (*а*) и гибридных (*б*, *в*) аденовирусов.

T — ген Т-антигена SV40; *B* — сайт рестриктазы *Bam*HI; цифрами обозначены единицы карты вирусного генома

ровал недостающие функции гибридного варианта, а гибрид, в свою очередь, за счет продукции Т-антигена вируса SV40 обеспечивал размножение аденовируса-помощника.

Рестрикционный анализ вирусных ДНК позволил выявить различные гибриды (см. рис. 14.18, *б*). Исследование экспрессии клонированных в Ad кодирующих последовательностей SV40 показало, что вирус Ad-SVR6 эффективно направлял в клетках CV-1 продукцию Т-антигена SV40, причем Т-антиген синтезировался как поздний аденовирусный белок. В клетках, инфицированных Ad-SVR15, уровень продукции Т-антигена был значительно ниже. Результаты экспериментов убедительно показали, что обычными методами рекомбинации молекул ДНК *in vitro* можно конструировать гибридные аденовирусы. Инициация транскрипции встроенных чужеродных кодирующих последовательностей может происходить как с позднего (Ad-SVR5), так и с ранних (Ad-SVR15) промоторов вектора. Гибридные транскрипты при этом могут подвергаться правильному сплайсингу, что приводит к синтезу полноценных чужеродных белков.

На следующем этапе этих исследований предприняли попытку более точно встроить кодирующую последовательность Т-антигена SV40 под промотор MLP аденовируса. С этой целью фрагмент аденовирусной ДНК (от 11,6 до 17 ед. карты) в бактериальной плазмиде состыковали с *Hin*dIII–*Bam*HI-фрагментом ДНК SV40. В сконструированном гибридном гене триплет ATG гена SV40 отстоял на 200 пн от точки инициации транскрипции с MLP. Такой гибридный ген был встроен в ДНК аденовируса 1×51i по *Bam*HI-участку в положении 29 ед. карты. После котрансфекции клеток линии 293 гибридной ДНК и ДНК аденовируса-помощника, пассирования полученного лизата на клетках CV-1 был отобран гибридный вирус Ad-SVR26 (см. рис. 14.18, *в*). Оказалось, что в результате рекомбинации по дуплицированным областям (11,6–17 ед. карты) *in vivo* произошло выщепление фрагмента вирусного генома. Ad-SVR26 направлял с промотора MLP синтез мРНК размером 2150 и 2350 нуклеотидов. Обе мРНК кодировали белки, иммунопреципитируемые антителами против Т-антигена SV40 и немного отличающиеся от Т-антигена

по размеру. Уровень синтеза этих мРНК в клетках, инфицированных Ad-SVR26, примерно в 50–100 раз превышал уровень синтеза мРНК Т-антигена, выявляемый в клетках, инфицированных SV40. Однако эффективность синтеза чужеродного белка была не столь высокой, так как гибридные мРНК не имели 5′-концевых лидерных последовательностей, специфичных для поздних аденовирусных мРНК.

По аналогичной схеме Д. Солник (1981 г.) сконструировал *in vitro* гибридный аденовирус, экспрессирующий Т-антиген SV40. Автор состыковал в плазмиде *Hin*dIII–*Bam*HI-фрагмент ДНК из области ранних генов SV40 с *Alu*I-фрагментом, содержащим поздний аденовирусный промотор. Клонированный гибридный ген затем был сшит с помощью ДНК-лигазы с левым концевым *Eco*RI-A фрагментом ДНК вируса Ad5 и правым концевым *Bam*HI-D фрагментом генома вируса Ad2$^+$ND1 (рис. 14.19). Полученный гибридный вирус R105 размножался в присутствии вируса-помощника, но его содержание в смешанной популяции составляло лишь 5–10 %. Тем не менее в клетках CV-1, инфицированных R105, синтезировалось в 3–5 раз больше Т-антигена, чем в тех же клетках, инфицированных SV40. Продукция t-антигена SV40 хотя и выявлялась в клетках, инфицированных гибридным аденовирусом, но ее уровень был по непонятным причинам низким.

Н. Стоу (1981 г.), используя GC-коннекторный метод, клонировал по *Pst*I-участку плазмиды pBR322 левый концевой *Hpa*I-E фрагмент ДНК Ad2 (0–4,5 ед. карты). Из полученной гибридной плазмиды с помощью рестриктаз выщепили фрагмент вирусной ДНК (0–3,8 ед. карты) и сшили его ДНК-лигазой с правым концевым *Xba*I-фрагментом (3,8–100 ед. карты) генома делеционного варианта Ad5 dl309. Гибридная ДНК была инфекционна, несмотря на наличие дополнительных нуклеотидов на левом конце молекулы. Учитывая полученные результаты, К. Беркнер и П. Шарп (1982 г.) клонировали в составе pBR322 с помощью линкеров *Eco*RI-A (0–76 ед. карты) и *Bam*HI-B (60–100 ед. карты) фрагменты ДНК Ad5. Гибридные плазмиды обозначили pBR322(0–76) и pBR322(60–100). Выщепленные из плазмид *Eco*RI-фрагменты вирусной ДНК 0–76 и 76–100 ед. карты сшивали с помощью ДНК-лигазы и после трансфекции клеток линии 293 получали вирусное потомство. Кроме того, удалось показать, что если клонированные фрагменты аденовирусной ДНК, содержащие перекрывающиеся последовательности, совместно ввести в клетки, то

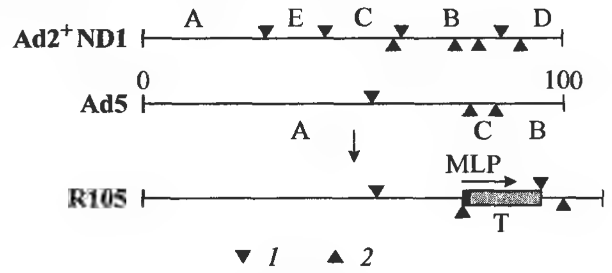


Рис. 14.19. Конструирование *in vitro* гибридного аденовируса R105.

Буквами обозначены рестрикционные фрагменты, образуемые ферментами *Bam*HI (*1*) и *Eco*RI (*2*). R105 получен в результате лигирования фрагментов *Eco*RI-A Ad5, *Bam*HI-D Ad2$^+$ND1 и гибридного гена Т-антигена SV40

в результате рекомбинации по гомологичным участкам *in vivo* образуется полноценный вирусный геном.

Таким образом, клонированные концевые фрагменты аденовирусной ДНК сохраняют свою биологическую активность. Это позволяет существенно упростить процедуру конструирования гибридных аденовирусов, содержащих чужеродные гены.

Как отмечалось выше, в первых экспериментах методами генетической инженерии конструировали дефектные гибридные аденовирусные геномы, для функционирования которых был необходим вирус-помощник. Исследователи вынуждены были работать со смешанной популяцией вирусов, причем содержание гибридного вируса в такой популяции было не более 10 %. В связи с этим несомненный интерес представляет разработка векторной системы аденовирусов, не требующей использования вируса-помощника.

Недефектные гибридные аденовирусы можно получать при встройке чужеродных фрагментов ДНК в область 79–86 ед. карты вирусного генома, несущественную для продуктивной инфекции аденовируса. При этом для формирования инфекционных вирионов величина молекулы вирусной ДНК не должна превышать 105 % генома Ad дикого типа. Во фрагменте ДНК Ad5, содержащемся в pBR322(60–100), находятся сайты рестриктазы *Xba*I в положениях 79 и 84 ед. карты. Данную плазмиду К. Беркнер и П. Шарп (1982 г.) обработали *Xba*I и циклизовали с помощью ДНК-лигазы. В результате был получен делеционный вариант плазмиды pBR322(60–100, Δ79–84), имеющий единственное место гидролиза рестриктазой *Xba*I в положении 79/84. По данному *Xba*I-участку встроили фрагмент Ad5, несущий ген *E1b* (3,8–15,5 ед. карты). Гибридный фрагмент соединили *in vitro*

с фрагментом ДНК (0–76) вируса Ad5 dl313 (делеционный мутант, утративший ген *E1b*). После трансфекции лигазной смесью клеток линии 293 получили вирусное потомство и изучили экспрессию клонированного гена *E1b* в клетках HeLa.

Н. Сайто с соавторами (1985 г.) в эту же несущественную область генома Ad5 встроили бóльшую часть (87 %) генома вируса гепатита B, помещенную под контроль MLP. Полученный гибридный вирус Ad5-HBL размножался в клетках HeLa без вируса-помощника. Последовательность HBV правильно транскрибировалась в составе гибридного генома. Тем не менее трансляции мРНК HBV не обнаружено. Это согласуется с данными других лабораторий о том, что для эффективной трансляции чужеродных мРНК на поздней стадии инфекции клеток аденовирусом обычно необходимо, чтобы эти мРНК на 5′-конце имели лидерную последовательность поздних аденовирусных мРНК. Однако это требование, по-видимому, не является универсальным. Например, Ф. Алонсо-Каплен с соавторами (1988 г.) показали, что ген-эквивалент белка нуклеокапсида вируса гриппа экспрессируется в составе аденовирусного генома под контролем промотора MLP независимо от наличия или отсутствия трехсегментной лидерной последовательности поздней мРНК аденовируса.

Д. Джонсон с соавторами (1988 г.) в район гена *E3* Ad5 встроили гибридный ген, состоящий из раннего промотора SV40 и ген-эквивалента гликопротеина B (gB) вируса простого герпеса типа 1. Гибридный вирус AdgB-2 эффективно реплицировался в культуре клеток и детерминировал высокий уровень продукции gB.

При встройке фрагментов в другие области аденовирусной ДНК будут получаться дефектные вирусы. Однако, если использовать комплементирующую линию клеток 293, в которой экспрессируются гены *E1a* и *E1b* вируса Ad5, вирусы с нарушенной ранней областью *E1* способны размножаться без вируса-помощника. Так, К. Беркнер и П. Шарп в составе плазмиды к небольшому концевому левому фрагменту (350 пн) аденовирусной ДНК, содержащему последовательности, необходимые для репликации и упаковки ДНК, подстроили гибридный ген, состоящий из MLP аденовируса, кДНК гена дигидрофолатредуктазы и участка полиаденилирования SV40. Полученную последовательность лигировали с *Xba*I-фрагментом Ad5 dl309 (3,8–100 ед. карты) и после трансфекции клеток линии 293 успешно отобрали клоны гибридных вирусов без использования вируса-помощника.

Ю. Глузман с соавторами (1982 г.), делетировав *in vitro* *Xba*I-фрагмент в районе 1,4–9,1 ед. карты генома Ad5, сконструировали вирус Ad5Δ*E1*/dl309, который содержал в месте делеции единственный *Xba*I-сайт. По этому сайту встроили гибридный ген, состоящий из позднего промотора аденовируса и кодирующей последовательности гена *A* вируса SV40. При инфекции клеток 293 гибридными вирусами наблюдали продукцию T- и t-антигенов SV40, сравнимую по уровню с синтезом структурных белков аденовируса. Ориентация встроенного гена относительно генома векторного вируса не оказывала заметного влияния на эффективность синтеза чужеродных белков. Гибридные вирусы при пассировании на культуре клеток были стабильны.

В этой же лаборатории в 1986 г. в состав Ad5Δ*E1*/dl309 встроили ген-эквивалент большого T-антигена вируса полиомы (Py), объединенный с MLP аденовируса типа 2. В клетках линии 293, инфицированных полученным гибридным вирусом Ad5PyR39, наблюдали синтез T-антигена Py. Причем уровень продукции этого белка был в 5 раз выше, чем в клетках мыши, инфицированных вирусом полиомы.

К. ван Дорен с соавторами (1984 г.), введя в район гена *E1* аденовируса 5 гибридный ген, состоящий из промотора вируса SV40 и структурного гена бактериальной аминогликозид-3′-фосфотрансферазы, получили гибридный вирус, который обеспечивал устойчивость культур клеток к антибиотику G-418. Гибридный вирус эффективно размножался без вируса-помощника на культуре 293, а при инфицировании культур CV-1 и Rat2 вирусная ДНК интегрировалась в геном клеток.

В рассмотренных работах гибридные вирусные геномы обычно конструировали *in vitro* и затем трансфицировали в чувствительные клетки млекопитающих. В редких случаях рекомбинантные аденовирусы отбирали после введения котрансфекцией вирусной ДНК и гибридной плазмиды в клетки млекопитающих и последующей гомологичной рекомбинации *in vivo*. Однако в последнем случае часто образовывались вирусные клоны с незапланированной структурой генома, поэтому требовался анализ относительно большого числа независимых вирусных клонов и их тщательная очистка от возможного загрязнения нерекомбинантным вирусом.

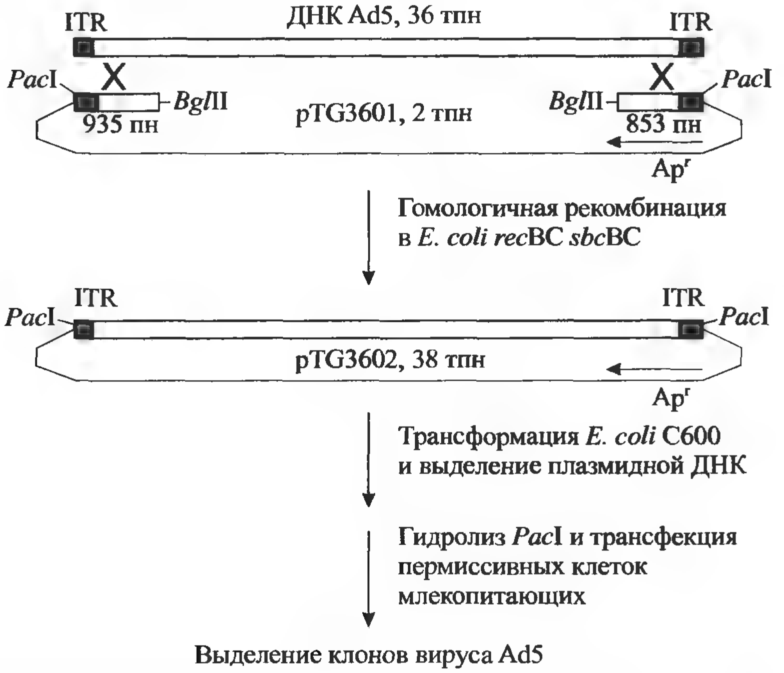


Рис. 14.20. Рекомбинационное клонирование полноразмерного генома аденовируса в клетках *E. coli*

К. Шартер с соавторами в 1996 г. предложили новый подход, состоящий в создании рекомбинантных аденовирусных геномов в клетках *E. coli* с использованием высокоэффективной бактериальной системы гомологичной рекомбинации. На первом этапе полноразмерный геном Ad5 (36 тпн) и плазмиду pTG3601 (2 тпн), гидролизованную рестриктазой *Bgl*II, совместно ввели в клетки *E. coli*, где произошла рекомбинация по областям гомологии и весь аденовирусный геном встроился в плазмиду (рис. 14.20). Полученная гибридная плазмида pTG3602 была стабильна в бактериальных клетках. Встроенный в плазмиду вирусный геном был ограничен местами гидролиза рестриктазой *Pac*I, участки узнавания которой в ДНК вируса Ad5 отсутствуют. После расщепления pTG3602 рестриктазой *Pac*I и трансфекции полученным гидролизатом клеток линии 293 образовывалось большое число вирусных бляшек. В дальнейшем плазмиду pTG3602 использовали для встройки целевых последовательностей: в район аденовирусного гена *E3* был встроен промотор вируса саркомы Рауса (рис. 14.21, *а*), а в район гена *E1* — экспрессионная конструкция человеческого фактора коагуляции IX (рис. 14.21, *б*). Полученные в бактериальных клетках рекомбинантные вирусные геномы в пермиссивных для Ad5 клетках млекопитающих дали начало вирусам с конститутивной экспрессией гена *E3* или эффективной продукцией фактора IX.

Разработанный упрощенный метод создания рекомбинантных аденовирусов получил широкое распространение и используется многими лабораториями.

Как уже отмечалось, при конструировании молекулярных векторов на основе аденовирусов почти весь вирусный геном (до 36 тпн) можно заместить чужеродной ДНК, выращивая гибрид в присутствии вируса-помощника. Такая конструкция получила название ***выпотрошенный вектор*** (gutless vector). Группа исследователей, руководимая Ф. Грэхэмом, предложила в 1996 г. эффективный метод удаления вируса-помощника из смеси с рекомбинантным аденовирусом. Авторы воспользовались свойствами системы сайтспецифической рекомбинации фага P1 *cre*/*lox* (см. подробнее 18.3.2). В геноме вируса-помощника последовательность Ψ^+, необходимую для упаковки ДНК в вирион, ограничили с двух сторон элементами *lox*P и ввели делецию по гену *E1*, чтобы вирус мог размножаться только на комплементирующей культуре клеток 293 (рис. 14.22). Выпотрошенный вектор содержит целевой ген и при необходимости балластную ДНК (например, ДНК фага λ), так как суммарный размер вирусной ДНК должен находиться в пределах 75–105 % генома дикого типа. Для разработанной векторной системы на основе культуры клеток линии 293 создали линию 293Cre, стабильно экспрессирующую фаговую рекомбиназу Cre. Котрансфекция клеток линии 293Cre ДНК рекомбинантного выпотрошенного аденовируса и вируса-помощника приводит к репликации и упаковке рекомбинантного вирусного генома за

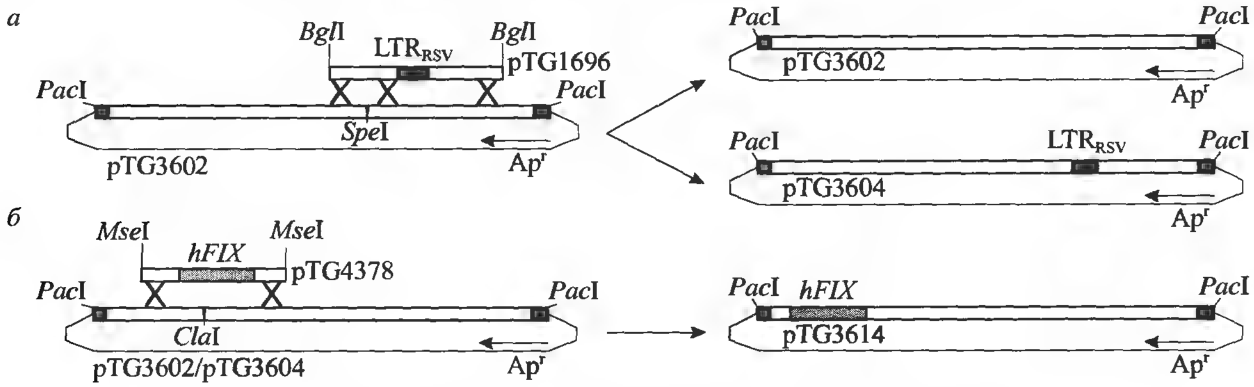


Рис. 14.21. Конструирование рекомбинантных аденовирусных геномов гомологичной рекомбинацией в *E. coli*:

а — встройка в ген *E3* участка, содержащего промотор вируса саркомы Рауса (LTR_{RSV});
б — встройка в ген *E1* гена человеческого фактора коагуляции IX (*hFIX*)

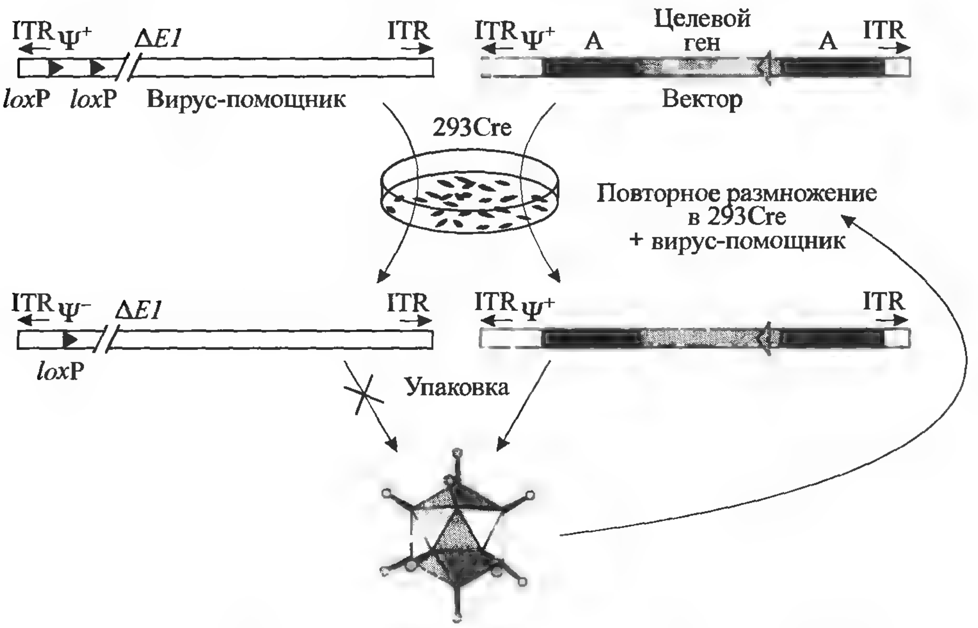


Рис. 14.22. Система получения выпотрошенных гибридных аденовирусов, свободных от вируса-помощника.

А — балластная ДНК; ITR — инвертированные концевые повторы

счет *транс*-функций вируса-помощника. В то же время участок Ψ^+ выщепляется из ДНК вируса-помощника, и она не может быть упакована в вирионы (см. рис. 14.22). Титр рекомбинантного вируса может быть увеличен в результате повторных пассажей на культуре клеток 293Cre, инфицированных рассмотренным вирусом-помощником.

Разработанный метод избавления от вируса-помощника был использован Ф. Грэхэмом с соавторами (1998 г.) для получения выпотрошенного аденовируса, экспрессирующего ген лептина — модулятора аппетита. Полученный рекомбинант сравнивали с аденовирусом, у которого ген лептина был встроен вместо гена *E1*, а остальная часть вирусного генома осталась без изменения. Оказалось, что выпотрошенный рекомбинантный Ad в отличие от классического гибридного Ad в организме экспериментальных животных проявляет гораздо меньшую гепатотоксичность и обеспечивает эффективную доставку и экспрессию целевого гена *in vivo*.

Таким образом, имеющиеся методы позволяют достаточно просто создавать различные рекомбинантные аденовирусы. Основными направлениями использования гибридных аденовирусов являются создание рекомбинантных вакцин и трансдукция целевых генов *in vivo* с целью генотерапии.

14.3.3. Рекомбинантные аденовирусные вакцины

Начиная с 1960-х гг. для предотвращения острых респираторных заболеваний персонал армии США вакцинируют живой аденовирусной вакциной, которая состоит из смеси неаттенуированных аденовирусов типов 4 и 7, часто являющихся причиной респираторных заболеваний. Вакцина упакована в капсулы, что исключает инфицирование дыхательных путей и обеспечивает доставку вирусного препарата в кишечник (оральная вакцина). Инфицирование кишечного тракта протекает бессимптомно, но создает эффективный иммунитет против гомологичных вирусов, а также выраженный, хотя и менее напряженный, иммунитет против других типов аденовирусов.

Развитие генно-инженерных работ на аденовирусах активизировало интерес исследователей к этим вирусам как молекулярным векторам для создания живых рекомбинантных вакцин не только против аденовирусов, но и против других патогенов. Поскольку аденовирусы проникают в организм через слизистые, они индуцируют не только системный, но и местный иммунный ответ (подробнее см. 19.6.2), что очень важно для защиты от различных инфекционных агентов. Рассмотрим некоторые из работ по созданию рекомбинантных вакцин на основе аденовирусов.

Одну из первых подобных работ выполнили С. Бэллей с соавторами (1985 г.). В район *E1* вируса Ad5 встроили кодирующие последовательности гена *S* или пре-*S2*-*S*-области HBV, поместив их под контроль промотора гена *E1a*. Гибридные аденовирусы продуцировали в клетках линии 293 полноценные белки вируса гепатита В, которые формировали иммуногенные HBsAg-частицы.

Г. Алхатиб и Д. Брэдис (1988 г.) продемонстрировали эффективный синтез гемагглютинина вируса кори в культуре 293, инфицированной гибридным аденовирусом, у которого ген-эквивалент гемагглютинина был встроен в район *E1* под контроль промотора MLP так, что последовательность, кодирующая трехсегментную лидерную последовательность поздней мРНК, сохранилась. Те же авторы показали, что при высокой множественности заражения гибридным аденовирусом некомплементирующих линий клеток HeLa и Vero (не экспрессируют *E1*) в них происходит, хотя и на низком уровне, синтез чужеродного белка.

А. Мэсон с соавторами (1988 г.) на основе аденовируса человека Ad7 получили два гибридных варианта, экспрессирующих поверхностный антиген вируса гепатита В. В первом гибриде в район гена *E3* вируса Ad7 под контроль промотора этого гена встроили кодирующую последовательность HBsAg. В другом гибриде ген-эквивалент HBsAg, объединенный с промотором MLP и лидерной 5′-концевой частью поздних генов, ввели в район между геном *E4* и ITR. Оба гибридных вируса были недефектны и нормально размножались на культуре клеток. Хотя аденовирусы имеют очень узкий круг хозяев, для них удается подобрать частично чувствительных лабораторных животных. Так, Ad4 способен ограниченно реплицироваться в организме хомяков, а Ad7 — собак. При заражении большой дозой гибридного вируса в организме лабораторных животных обнаружено формирование иммунного ответа как против аденовируса, так и против вируса гепатита В.

С. Джакобс с соавторами (1992 г.) встроили в район гена *E1* вируса Ad5 кодирующую последовательность белка NS1 вируса клещевого энцефалита, состыкованную с конститутивным промотором цитомегаловируса, и в экспериментах на мышах продемонстрировали, что инъекция рекомбинантного аденовируса обусловливала развитие иммунного ответа и защиту животных от вируса клещевого энцефалита.

А. Фукс с соавторами (1998 г.) создали репликативно дефектный вирус Ad5, продуцирующий гемагглютинин вируса кори, и на модели мышей при оральной вакцинации выявили его защитный эффект против этой инфекции.

К. Брюс с соавторами (1999 г.) показали, что Ad5, экспрессирующий ген *env* вируса иммунодефицита человека, обусловливает как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ против данного вируса у мышей.

Вопрос об использовании гибридных аденовирусов в качестве живых вакцин для человека пока окончательно не решен. Эксперименты на модельных системах часто не дают однозначных результатов. Применение же гибридных вариантов аденовирусов для иммунизации животных является более простой задачей, поскольку свойства таких вирусов можно изучать сразу на естественных хозяевах.

Например, Г. Баер с соавторами (1989 г.) показали возможность оральной вакцинации собак через приманки, содержащие собачий аденовирус типа 2. В высоких титрах этот вирус вызывает образование вируснейтрализующих антител также у лисиц, скунсов, енотов и мангустов. После введения в геном такого вируса экспрессируемого ген-эквивалента протектив-

ного антигена вируса бешенства можно получить живую аденовирусную вакцину. Она будет обеспечивать эффективную вакцинацию диких животных против бешенства с помощью приманок, содержащих гибридный аденовирус. Причем иммунизированные животные могут передавать гибридный аденовирус другим особям обычным воздушно-капельным путем. Тем самым аденовирусы могут обеспечить достижение более высокого уровня вакцинации популяции диких животных по сравнению с другими вирусными системами, например ортопоксвирусами (см. 14.5).

Л. Фишер с соавторами (2002 г.) создали рекомбинантные варианты CAV2, продуцирующие гемагглютинин или F-антиген вируса чумы собак (родствен вирусу кори человека). Интраназальная иммунизация щенков смесью рекомбинантных аденовирусов обеспечивала эффективную защиту животных от вируса чумы собак.

14.3.4. Генная терапия

Аденовирусы обладают рядом свойств, которые позволяют рассматривать их в качестве перспективной векторной системы для генной терапии:

- аденовирусные частицы способны инфицировать широкий спектр разных типов клеток (как делящихся, так и покоящихся) чувствительного хозяина;
- вирусная ДНК в составе капсида доставляется к ядру зараженной клетки, переносится в ядро, где происходит экспрессия генов, находящихся в вирусном геноме;
- аденовирусы человека не онкогенны;
- гибридные репликативно дефектные аденовирусы способны размножаться только в специальных комплементирующих культурах клеток, но не в зараженном организме, обеспечивая при этом трансдукцию целевых терапевтических генов в ядра клеток *in vivo*;
- в геном аденовирусов может быть встроен значительный объем генетического материала (до 36 тпн).

Кроме того, современная технология производства и очистки аденовирусов обеспечивает возможность получения препаратов с титром до 10^{13} частиц на 1 мл, пригодных для клинического применения.

Наибольшее число работ с аденовирусами направлены на создание стратегий генной терапии раковых опухолей. Первая группа исследований посвящена супрессии опухолей. Известно, что мутации в гене белка p53 приводят к развитию у человека различных опухолей. Трансдукция с помощью гибридных аденовирусов гена белка p53 дикого типа позволила эффективно подавлять образование некоторых опухолей на модельных системах лабораторных животных. Проводятся клинические испытания таких гибридных аденовирусов при терапии рака легких, печени, области головы и шеи.

Другой подход состоит в селективном уничтожении раковых клеток. Для этого в аденовирусный вектор встраивают так называемый ***суицидный ген***. В этих целях активно используют ген тимидинкиназы вируса герпеса. Тимидинкиназа вируса герпеса способна фосфорилировать ганцикловир. При введении этого препарата в зараженных гибридным Ad клетках будет происходить терминация синтеза ДНК, что в итоге приведет к их гибели. Другой суицидный ген кодирует цитозин-дезаминазу, которая модифицирует введенный 5-флуороцитозин, что также является губительным для клетки. Терапия опухолей с помощью суицидных гибридов аденовирусов, совмещенная с радиотерапией, может приводить к значительному уменьшению опухоли. Во всех случаях наилучший результат удается получить при направленном инфицировании опухоли аденовирусом и использовании для экспрессии целевого гена тканеспецифичных промоторов.

Исследования последних 15 лет показали, что главными недостатками аденовирусов при трансдукции генов являются иммунный ответ против белков вируса и токсичность для печени при системном введении Ad в высокой концентрации. С первым можно бороться, используя выпотрошенные аденовирусные векторы, со вторым — вводя аденовирус непосредственно в орган-мишень.

Другой недостаток аденовирусов — широкий тканевой тропизм. Поэтому ученые уделяют большое внимание получению аденовирусов, специфичных к определенному типу клеток.

В 1997 г. на поверхности клеток млекопитающих был выявлен гликопротеин КАР — первичный рецептор Ad2 и Ad5 человека, с которым высокоаффинно связывается глобулярный домен шипов вирионов. Шипы аденовирусных капсидов являются гомотримерами полипептида (у Ad5 имеет размер 582 АК), в котором выделяют три основных домена: N-концевой хвостовой домен (ХД), центральный домен (ЦД) и С-концевой глобулярный домен (ГД) (рис. 5 на цв. вклейке). Короткий ХД обеспечивает встраивание шипов в вирион и перенос

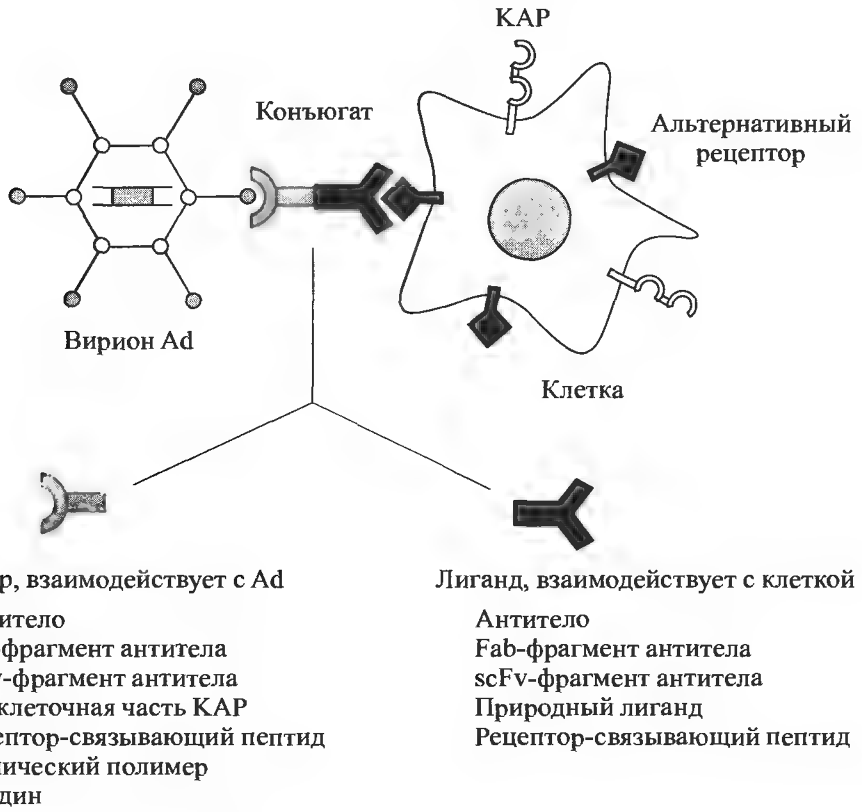


Рис. 14.23. Нацеливание аденовируса на определенный тип клеток с использованием конъюгатов

синтезируемых шипов из цитоплазмы в ядро. ГД необходим для тримеризации полипептида.

После прикрепления к первичному рецептору Ad связывается с интегринами, которые обеспечивают вхождение вириона внутрь клетки. Поэтому интегрины называют вторичными рецепторами аденовирусов.

Тканевая специфичность векторного вируса определяется уровнем экспрессии вирусных рецепторов на поверхности составляющих ткань клеток. КАР и интегрины экспрессируются многими типами клеток человека. Это позволяет использовать аденовирусы для генной терапии при локальном введении, однако при системном введении широкий тканевой тропизм Ad приводит к неадресной доставке терапевтического гена.

Нацеливать аденовирус на определенные клетки, имеющие специфичные поверхностные антигены, наиболее просто удается с помощью конъюгатов (рис. 14.23). Данный подход реализован на различных раковых опухолях, для которых показана селективная трансдукция аденовирусными векторами встроенных в них трансгенов. Несмотря на очевидные достоинства, стратегия использования адаптерно-лигандных комплексов имеет серьезный недостаток — многоступенчатость процедуры приготовления *in vitro* нацеленного гибридного аденовируса. Поэтому ведутся исследования по генетической модификации тропизма аденовирусов.

Большой вклад в развитие этих исследований внесли сотрудники лаборатории Д. Куриэля (1996–2003 гг.). Они показали, что в состав петли HI глобулярного домена шипа в некоторых случаях можно вводить протяженные полипептидные последовательности (до 80 АК), не нарушая сборку инфекционных вирусных частиц. При этом можно изменить специфичность взаимодействия вируса с клетками, нацелив его на другие белки, находящиеся на поверхности клеток.

Наиболее эффективный способ направленно изменить тропизм аденовируса — замена ГД шипа на полипептид, активно взаимодействующий со строго специфичным белком, например поверхностным антигеном определенных опухолевых клеток. В. Н. Красных с сотрудниками (2001 г.) создали гибридный Ad5, который синтезировал химерный шип. Химерная молекула состояла из ХД и части ЦД аденовирусного шипа, а также последовательности большей части α-спирального домена и полимеризующего домена (фолдона) фибритина фага Т4 (фибритин — гомотример белка длиной 487 АК, образующий гибкие усики, прикрепленные к шейке фагового капсида), к С-концу которого подстроили последовательность из 6 молекул гисти-

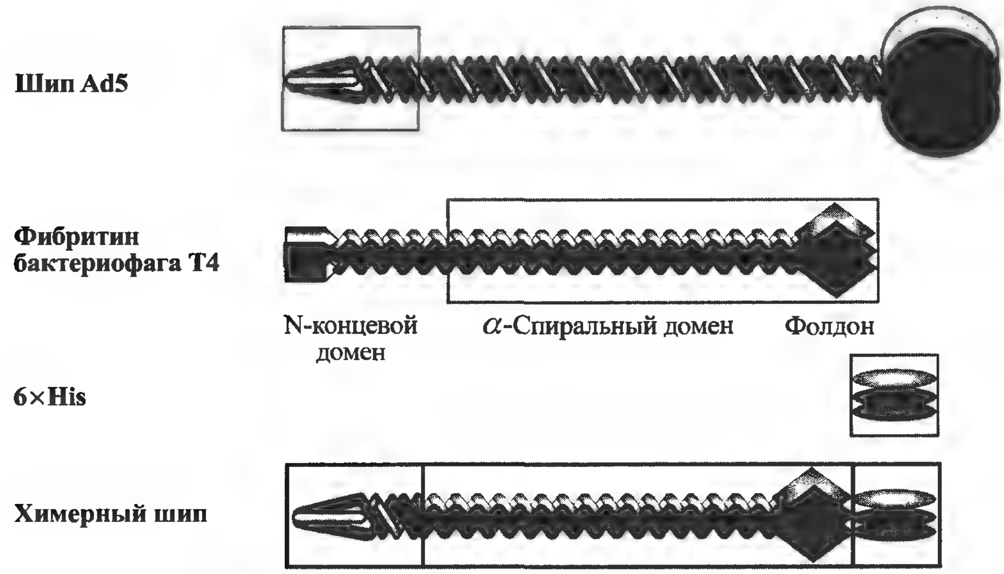


Рис. 14.24. Конструирование химерного шипа аденовируса

дина 6×His (рис. 14.24). Полученный аденовирус не заражал клетки, несущие рецептор КАР, но эффективно инфицировал клетки, продуцирующие искусственный рецептор для 6×His.

В 2003 г. эти же авторы создали новый вариант аденовируса с химерным шипом, у которого вместо 6×His была встроена последовательность CD40L человека. Гибридный вирус эффективно инфицировал дендритные и раковые клетки, на поверхности которых находится рецептор CD40 и практически отсутствует КАР.

Таким образом, можно надеяться на то, что по мере разработки нацеленных аденовирусных векторов на их основе будут созданы эффективные противораковые генно-терапевтические препараты.

14.4. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ ВИРУСОВ СЕМЕЙСТВА HERPESVIRIDAE

Герпес — самая распространенная вирусная инфекция человека, длительно существующая в организме, преимущественно в латентной форме.

Известно восемь видов вирусов герпеса, для которых человек является естественным хозяином. К ним относятся: вирусы простого герпеса типа 1 (HSV-1, или по новой номенклатуре — HHV-1) и типа 2 (HSV-2, или HHV-2), вирус ветряной оспы, или опоясывающего герпеса (VZV, или HHV-3), вирус Эпштейна–Барр (EBV, или HHV-4), цитомегаловирус человека (hCMV, или HHV-5), а также герпесвирусы человека типов 6, 7, 8 (HHV-6, -7, -8). Кроме того, выделено более 70 герпесвирусов от различных животных.

Принадлежность к семейству Herpesviridae определяется присутствием в составе вириона крупной двухцепочечной линейной молекулы ДНК (120–220 тпн), которая пакуется в ядре клетки в белковый капсид и окружается оболочкой, образующейся из ядерной мембраны.

Герпесвирусы крайне разнообразны по биологическим свойствам. Некоторые из них, например HSV-1 и HSV-2, имеют широкий спектр хозяев. Они очень эффективно размножаются, быстро разрушая зараженные клетки. Другие, в частности hCMV, размножаются довольно медленно и обладают менее выраженным цитопатическим действием. Существуют герпесвирусы, способные вызывать злокачественные опухоли. Одним из наиболее характерных свойств герпесвирусов является их способность оставаться в латентном состоянии в организме зараженного ими хозяина.

Наиболее хорошо изучен вирус простого герпеса типа 1. Практически все известные культуры клеток животных пермиссивны для его развития. В 1988 г. опубликована полная нуклеотидная последовательность (152 260 пн) одного из его штаммов. Геном HSV-1 (рис. 14.25) состоит из длинного (L) и короткого (S) ковалентно связанных сегментов, каждый из которых содержит области уникальных последовательностей (U_L и U_S соответственно), фланкированных инвертированными повторами (TR_L, IR_L, IR_S и TR_S). На долю L-сегмента приходится 82 % ви-

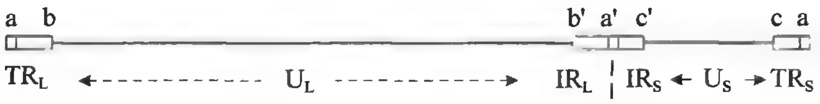


Рис. 14.25. Структура генома вируса простого герпеса

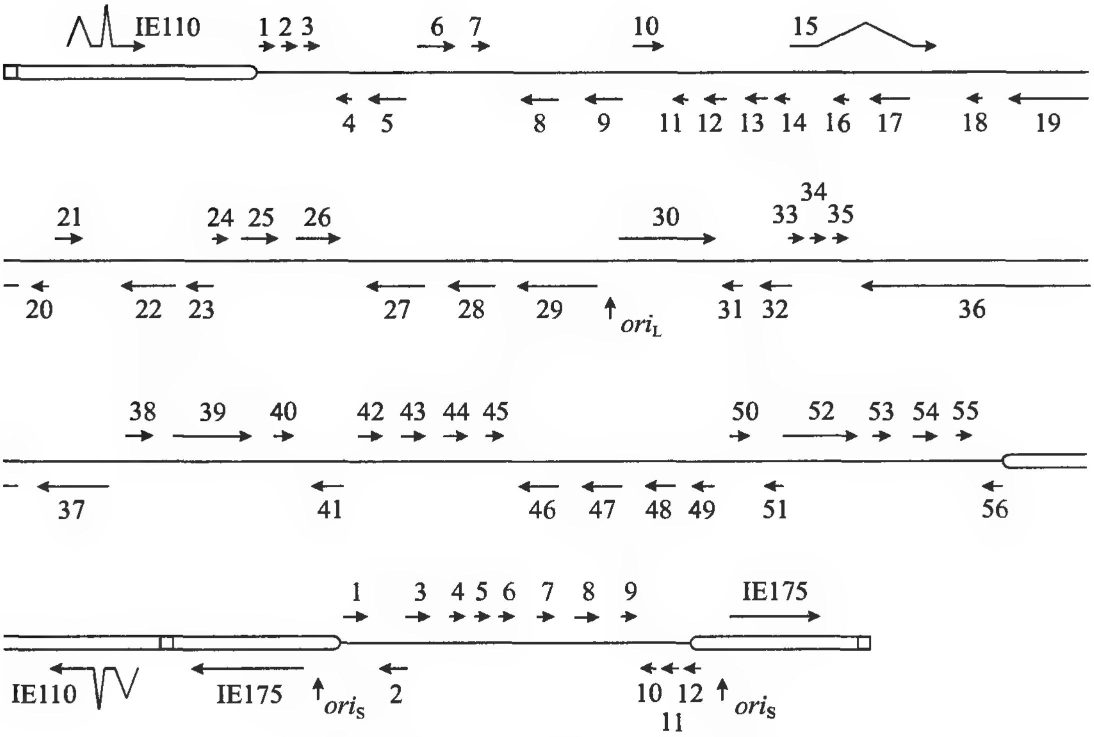


Рис. 14.26. Генетическая карта ДНК HSV-1.

Геном представлен в виде четырех линий с разбивкой по 40 тпн. Открытые рамки считывания обозначены стрелками и пронумерованы отдельно в L- и S-сегментах, участки сплайсинга отмечены изломами линий.
IE — инвертированные элементы

русной ДНК. Сегмент «а» размером 400 пн трижды повторяется в геноме HSV-1. На концах вирусной ДНК этот сегмент расположен в прямой ориентации, а в месте соединения L- и S-сегментов — в противоположной. За счет сайтспецифической рекомбинации по инвертированным повторам *in vivo* происходит инверсия L- и S-сегментов относительно друг друга. В результате препарат ДНК, выделенный из вирионов HSV-1 дикого типа, содержит в эквимолярном соотношении четыре изомерные формы, соответствующие четырем вариантам взаимной ориентации L- и S-сегментов.

На геноме HSV-1 локализовано 72 предполагаемых гена и три участка начала репликации (рис. 14.26). Показано, что для успешной репликации ДНК HSV-1 необходимы белковые продукты по крайней мере семи вирусных генов.

ДНК вируса герпеса после проникновения в ядро клетки, по-видимому, циклизуется и на ранних стадиях реплицируется в так называемой θ-форме. Затем репликация вирусной ДНК происходит по механизму катящегося кольца (в σ-форме), что приводит к образованию конкатемерных молекул, которые вовлекаются в процесс созревания и упаковки ДНК в капсиды. Для специфичного расщепления конкатемерных ДНК HSV при их упаковке в *цис*-положении необходима последовательность, находящаяся в районе «а».

Гены вирусов герпеса объединяют в пять групп (α, β_1, β_2, γ_1 и γ_2). Их экспрессия инициируется последовательно по каскадному типу, т. е. продукты α-генов запускают транскрипцию β-генов, причем экспрессия генов β_1 начинается раньше, чем генов β_2, а β-гены в свою очередь необходимы для транскрипции γ-генов. Показано, что для инициации функционирования герпесвирусного генома необходимы по крайней мере три регуляторных α-белка. Первым в каскад регуляции включается *транс*-ин-

дуцирующий фактор (αTIF) — вирионный белок, который обеспечивает транскрипцию α-генов после проникновения вирусных частиц в инфицированные клетки. Основным α-регуляторным белком является продукт гена $\alpha 4$, необходимый для экспрессии большинства β- и γ-генов. Важную роль в активации транскрипции определенных генов также играет белок, кодируемый геном $\alpha 0$.

Вирусы простого герпеса, а также ветряной оспы, нейротропны. Они находятся в латентном состоянии в нервной ткани зараженного организма и персистируют в нем на протяжении всей жизни. Показано, что ДНК HSV-1 в латентном состоянии представляет собой кольцевую молекулу, имеющую нуклеосомную структуру, подобную структуре клеточного хроматина. Другие герпесвирусы лимфотропны. Они переходят в латентное состояние после инфицирования лимфоцитов.

Интересно, что HSV-1 был первым вирусом, у которого С. Кит и Д. Дабс (1965 г.) обнаружили ген тимидинкиназы. В настоящее время известно, что этот ген не является необходимым для репликации вируса в культуре клеток и относится к генам группы β_1. Локализация гена *tk* на геноме и клонирование его в бактериальных плазмидах в составе *Bam*HI-Q-фрагмента ДНК HSV-1 (1979 г.) позволили подробно изучить его структуру и использовать в многочисленных исследованиях по генетической трансформации культивируемых клеток млекопитающих (см. 13.3.1).

14.4.1. Конструирование in vivo гибридных вирусов простого герпеса

Клонированный в составе плазмиды ген тимидинкиназы вируса простого герпеса был использован при разработке нового подхода к конструированию гибридных вирусов, которые имеют крупный геном и вследствие этого к ним неприменимы методы рекомбинации молекул ДНК *in vitro*. Б. Ройзман с сотрудниками в 1978–1979 гг. показали, что при совместной трансфекции клеток молекулами ДНК штамма HSV-1, имеющего термочувствительную мутацию, и определенным рестрикционным фрагментом ДНК вируса дикого типа удается осуществить так называемое спасение маркера. Оно происходит при рекомбинации *in vivo* фрагмента вирусного генома с мутантной ДНК вируса, в результате чего мутантный локус замещается локусом дикого типа.

Данную систему применили для встройки в геном вируса экзогенных фрагментов ДНК. При этом для эффективной селекции гибридных вирусов использовали ген *tk* HSV-1, так как он относится к несущественным генам и имеются простые и надежные методы отбора TK^+- и TK -вариантов. Например, вирусы с фенотипом TK^- отбирают на культуре клеток с поврежденным геном тимидинкиназы при введении в культуральную среду аналогов тимидина типа бромдезоксиуридина или тимидинарабинозида (AraT). В таких условиях потомство формируют только TK^--вирусы (подробнее см. 13.3.1).

В первых модельных экспериментах (1980 г.) было показано, что инактивированный *in vitro* делецией или встройкой экзогенной ДНК клонированный в плазмиде ген тимидинкиназы HSV-1 может быть легко перенесен в геном вируса простого герпеса котрансфекцией клеток TK^- гибридной плазмидой и вирусной ДНК (tk^+). Рекомбинантное вирусное потомство с фенотипом TK^- селектировали на среде с AraT.

Используя данный подход, в *Bam*HI-Q-фрагмент ДНК HSV-1 по единственному *Bgl*II-участку встроили фрагмент ДНК, содержащий промотор α-гена вируса простого герпеса. Данный промотор располагался между промотором гена *tk* и его кодирующей последовательностью. После рекомбинационной встройки *in vivo* такого гибридного гена в геном мутантного вируса HSVtk^- на HAT-среде выявляли варианты HSVtk^+. Анализ показал, что в отобранных рекомбинантных вирусах ген тимидинкиназы регулировался уже как ген α-типа. Данную схему предложено использовать для селекции промоторов других эукариотических генов.

В лаборатории Б. Ройзмана в 1983 г. в составе бактериальной плазмиды состыковали промотор гена $\alpha 4$ HSV-1 и кодирующую последовательность хромосомного гена овальбумина курицы. Экспрессия гибридного гена была подвержена такой же регуляции, как и экспрессия вирусного гена $\alpha 4$. На следующем этапе (1984 г.) в той же лаборатории в ген тимидинкиназы вируса простого герпеса рекомбинационно встроили ген-эквивалент поверхностного антигена S вируса гепатита B, объединенный с промотором либо гена $\alpha 4$, либо гена *tk* HSV-1. Отобранные по фенотипу TK^- гибридные варианты HSV-1 направляли эффективный синтез HBsAg, который секретировался из клеток и формировал специфичные частицы диаметром около 22 нм. Причем в зависимости от использованного промотора гибридный ген *S* экспрессировался или как ранний ген, или как ген β-типа.

Данная работа со всей очевидностью продемонстрировала возможность использования вируса простого герпеса в качестве экспрессирующего вектора. В связи с этим следует еще раз отметить, что HSV-1 имеет широкий круг чувствительных культур клеток, размножается в них с высокой эффективностью и может детерминировать продукцию чужеродных белков с последующим лизисом зараженных клеток, что в ряде случаев будет облегчать очистку целевых белков.

Предложенный и опробованный на примере HSV-1 метод рекомбинационной встройки *in vivo* в крупный геном чужеродной ДНК, фланкированной последовательностями, гомологичными несущественным областям этого генома, является достаточно общим, и в дальнейшем его использовали при встройке генов в ДНК других герпесвирусов и вирусов других семейств.

14.4.2. Разработка живых вакцин на основе герпесвирусов животных

В отличие от вируса осповакцины (см. 14.5), вирусы герпеса человека вряд ли можно рассматривать в настоящее время как перспективные объекты, на основе которых можно создавать поливалентные живые вакцины медицинского назначения. Во-первых, для герпесвирусов характерно латентное состояние и *a priori* не ясно, как может повлиять на организм долговременная продукция чужеродных антигенов. Во-вторых, в целом ряде случаев герпесвирусы связывают с образованием раковых опухолей. Все это не позволяет надеяться на быструю разработку и доведение до промышленного производства живых вакцин для человека на основе герпесвирусов.

С другой стороны, герпесвирусы млекопитающих представляют несомненный интерес для создания живых ветеринарных вакцин. Вирус, находящийся в латентном состоянии и продуцирующий при этом чужеродный антиген, должен обеспечивать надежную защиту организма от соответствующего инфекционного агента. Кроме того, гибридный вирус в латентной форме потенциально может «излечивать» определенные дефекты инфицированного организма по продукции того или иного полипептида.

Первую успешную работу в этом направлении выполнили Р. Десрозерс с соавторами (1985 г.) на герпесвирусе саймири. Естественным хозяином данного вируса является беличья обезьяна. Герпесвирус саймири лимфотропен и обладает способностью индуцировать лимфому. Был локализован район генома этого вируса, отвечающий за неопластическую трансформацию Т-клеток *in vitro*. Делеция данного района приводила к тому, что вирус становился непатогенным и обусловливал латентное протекание инфекции. В состав генома этого вируса встроили хромосомный ген гормона роста быка (bGH), помещенный под контроль позднего промотора вируса SV40. При инфицировании обезьян гибридным герпесвирусом наблюдали эффективный синтез и циркуляцию в организме экспериментальных животных белка bGH и появление антител к этому белку.

М. Грэсманн и А. Флекенштейн (1989 г.) в состав генома герпесвируса саймири встроили ген *neo*, состыкованный с ранним промотором SV40 (из плазмиды pSV2-*neo*), и продемонстрировали возможность селекции гибридных вирусов на среде с антибиотиком G-418. Использование данного доминантного селективного маркера позволяет достаточно просто отбирать гибридные варианты вируса, в геном которых вместе с геном *neo* встраиваются любые другие целевые гены.

Несомненный интерес для разработки ветеринарных вакцин представляет вирус псевдобешенства (PRV). Он является герпесвирусом свиней, имеет очень широкий круг чувствительных животных, но не инфицирует человека. С. Томсен с соавторами (1987 г.) показали, что в PRV ген тимидинкиназы инактивирован. Кроме того, они выявили вирусный ген, детерминирующий синтез основного гликопротеина gX, и показали, что мутация по этому гену не нарушает репликацию вируса как *in vitro* (в культуре клеток), так и *in vivo*. Был получен вариант вируса PRVΔGX1, в геноме которого под контроль промотора гена *gX* встроили кодирующую часть гена тимидинкиназы HSV-1. Данный TK^+-вирус затем использовали, чтобы ввести в тот же район генома ген *tPA* активатора тканевого плазминогена человека. При рекомбинационной встройке ген тимидинкиназы замещался геном *tPA* (рис. 14.27), и вирус приобретал фенотип TK^-. Гибридные варианты вируса PRV отбирали на среде с AraT. Они направляли в инфицированных клетках синтез полноценного белка tPA.

М. Уили с соавторами (1988 г.) встроили в состав гена гликопротеина gIII оболочки вируса псевдобешенства кодирующую последовательность поверхностных гликопротеинов gp120 и gp41 вируса иммунодефицита челове-

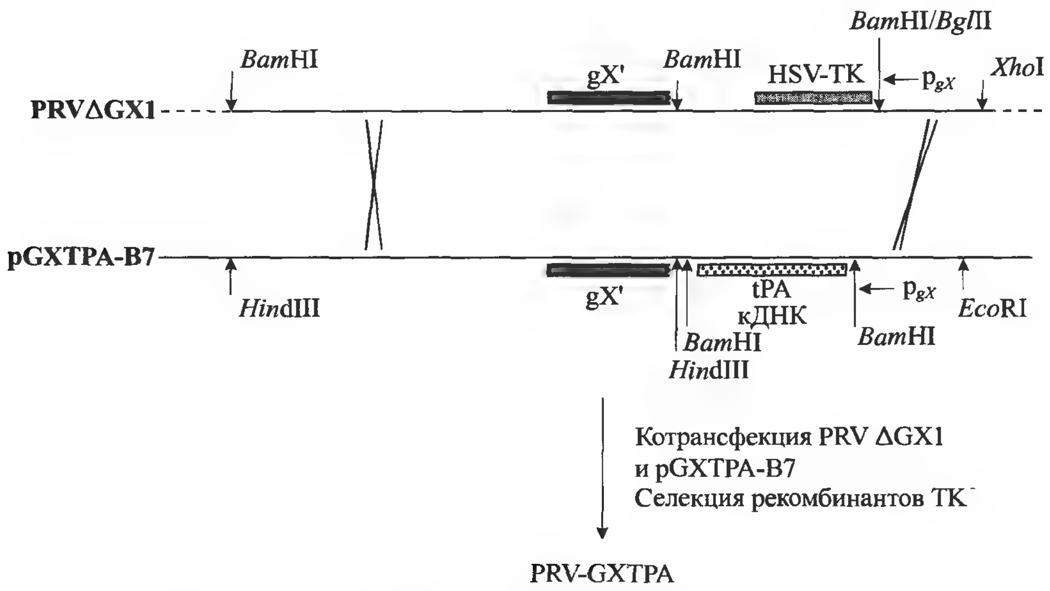


Рис. 14.27. Схема рекомбинации гибридной плазмиды pGXTPA-B7 с геномом векторного варианта PRVΔGX1 вируса псевдобешенства

ка. Полученный гибридный вирус псевдобешенства направлял синтез нового гликозилированного химерного белка, специфично взаимодействующего с антителами как против gIII, так и против gp120–gp41.

Использовать в качестве молекулярного вектора герпесвирус кошек (FHV) попытались Г. Коль с соавторами (1990 г.). В ген тимидинкиназы FHV рекомбинационно встраивали либо ген *env*, либо ген *gag* вируса лейкемии кошек (FeLV), объединенный с ранним промотором цитомегаловируса человека. Клетки, инфицированные гибридными вариантами FHV, продуцировали соответствующие чужеродные белки. Заражение кошек гибридами приводило к формированию в их организме иммунного ответа на синтезируемые белки FeLV. Таким образом, герпесвирус кошек можно рассматривать как основу для создания живых поливалентных вакцин против ряда инфекционных заболеваний этих животных.

14.4.3. HSV-ампликоны

В процессе пассирования HSV-1 при высокой множественности заражения культуры клеток в популяции вируса происходит постепенное накопление вирусных частиц с дефектным геномом. Как выяснилось, их геном имеет размер около 150 тпн и состоит из множества тандемно повторенных фрагментов ДНК HSV-1 размером от 3 до 30 тпн, содержащих последовательности, необходимые для репликации и созревания вирусной ДНК. Наличие в дефектном геноме множественных *ori* приводит к тому, что он имеет преимущество при репликации перед вирусной ДНК дикого типа. По-видимому, такие дефектные геномы возникают спонтанно с определенной частотой, но они могут размножаться только в присутствии вируса-помощника, т. е. при высокой множественности инфекции. В результате последовательных пассажей содержание дефектного вируса в популяции HSV может превышать 90 %.

В 1981 г. Д. Влажны и Н. Френкель показали, что после трансфекции культуры клеток кролика смесью нативной ДНК вируса простого герпеса и мономерной повторяющейся единицы (8,3 тпн) дефектного HSV-1 образуется полноразмерный (около 150 тпн) дефектный геном, состоящий из тандемных повторов введенного фрагмента 8,3 тпн. По-видимому, такой вирусный геном получался в результате репликации мономерной единицы по механизму катящегося кольца. При этом нативная ДНК HSV-1 обеспечивала *транс*-функции, необходимые для репликации и созревания вирусной ДНК. Дефектный геном эффективно упаковывался в капсиды. Аналогичные результаты были получены в 1982 г., когда в клетки кролика котрансфекцией с нативной ДНК HSV-1 ввели повторяющийся *Bgl*II-фрагмент (3,9 тпн) дефектного вируса простого герпеса штамма Patton.

Данные эксперименты натолкнули исследователей на мысль об использовании определенных сегментов вирусного генома в качестве амплифицирующих вирусных векторов. Прежде всего была изучена возможность введения в дефектный геном вируса чужеродной ДНК. Р. Спет и Н. Френкель (1982 г.) встроили по *Bgl*II-участку плазмиды pKC7 (производная

pBR322) повторяющийся *Bgl*II-фрагмент ДНК HSV-1 штамма Patton и получили гибридную плазмиду pP2-102. После котрансфекции культуры клеток молекулами ДНК вируса-помощника и плазмидой pP2-102 обнаружили дефектные вирусы, геном которых имел размер около 150 тпн и являлся конкатемерной формой ДНК pP2-102. Гибридные дефектные геномы были структурно стабильны по крайней мере в течение 15 пассажей в культуре клеток. Так как чужеродные последовательности были амплифицированы в геноме гибридного дефектного вируса простого герпеса, авторы назвали такой вектор HSV-ампликоном. Плазмида pP2-102 имеет единственное место действия *Eco*RI, поэтому после гидролиза данной рестриктазой молекул ДНК дефектного гибридного вируса выщеплялась линейная форма pP2-102, которую циклизовали с помощью ДНК-лигазы и трансформировали ею компетентные клетки *E. coli*. Из отобранных клонов *E. coli*, устойчивых к ампициллину, выделяли плазмиду pKC7, содержащую вирусный ампликон.

Таким образом, с помощью HSV-ампликона можно эффективно амплифицировать чужеродную генетическую информацию в клетках животных. Более того, если ампликон объединен с бактериальной плазмидой, то, выщепляя из дефектного генома гибридного вируса повторяющуюся единицу, можно восстановить исходную гибридную плазмиду и размножать ее в бактериальных клетках. При необходимости плазмиду можно снова ввести в клетки животных совместно с вирусом-помощником или его ДНК.

Н. Стоу и Е. Мак-Монегль (1982 г.) создали HSV-ампликон на основе рестрикционного фрагмента ДНК недефектного вируса простого герпеса. Для этого в плазмиду pMK16 по *Xho*I-участку встроили *Xho*I-C-фрагмент ДНК HSV-1 (рис. 14.28). Полученную гибридную плазмиду pGX58 котрансфекцией с интактной вирусной ДНК вводили в клетки хомяка. В такой системе pGX58 эффективно реплицировалась и в конкатемерной форме упаковывалась в капсиды. Гибридная плазмида pGX33, созданная на основе бактериальной плазмиды pAT153 и *Bam*HI-N-фрагмента ДНК HSV-1, в присутствии вируса-помощника также реплицировалась в клетках животных, но уже не была способна упаковываться в вирусные частицы. Это связано с тем, что *ori* находится в перекрывающемся сегменте *Xho*I-C- и *Bam*HI-N-фрагментов, в то время как участок, необходимый в *цис*-положении для созревания вирусной ДНК, расположен в районе повторяющегося участка «а» (см. рис. 14.25).

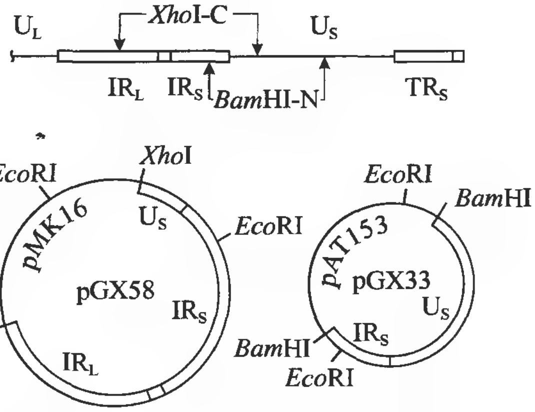


Рис. 14.28. Челночные векторные плазмиды pGX58 и pGX33.

Вверху показана локализация на геноме HSV-1 фрагментов ДНК, входящих в состав плазмид

Векторная система ампликона вируса простого герпеса имеет ряд особенностей, отличающих ее от эукариотических векторов других типов. Гибридная ДНК, состоящая из ампликона, соединенного с чужеродной последовательностью, реплицируется по механизму катящегося кольца и упаковывается в капсид как линейная молекула размером около 150 тпн. Поэтому в данном случае можно клонировать фрагменты ДНК, значительно варьирующие по длине. Также необходимо отметить, что популяция вирусов, содержащая гибридные дефектные геномы, может быть использована для инфекции практически любых культур клеток млекопитающих.

14.4.4. Плазмидные векторы на основе элементов генома вируса Эпштейна–Барр

Чтобы изучить, как изменение структуры гена влияет на его экспрессию в клетках животных, необходимо использовать внехромосомные клонирующие векторы. Это обусловлено тем, что экспериментально почти невозможно добиться интеграции модифицированных форм гена в одну и ту же точку генома и исключить эффект положения гена. Частично этот вопрос удается решить, используя векторы на основе репликона вирусов SV40, полиомы, а также папилломы быка. Однако каждый из указанных типов векторов имеет ограничения по спектру культур клеток, в которых они могут поддерживаться во внехромосомном состоянии. Поэтому возникла потребность в разработке дополнительных векторных систем, позволяющих клонировать и экспрессировать исследуемые гены внехромосомно в культивируемых клетках человека.

Лучше всего для этого подходит вирус Эпштейна–Барр (EBV). Оказалось, что EBV в ядре инфицированных В-лимфоцитов человека находится в виде многокопийных плазмид: вирусная ДНК представляет собой внехромосомные кольцевые молекулы, организованные в нуклеосомы. В таких латентно инфицированных клетках экспрессируется менее 10 % вирусного генома. М. Ятес с соавторами (1984–1985 гг.) показали, что для репликации ДНК EBV в латентном состоянии необходим и достаточен один *цис*-действующий элемент — *ori*P и один *транс*-действующий элемент — ген *EBNA-1*, кодирующий ядерный антиген вируса.

Исходя из этих данных в разных лабораториях в 1985–1989 гг. были сконструированы челночные плазмиды *E. coli*, содержащие *ori*P и ген *EBNA-1* вируса Эпштейна–Барр. В качестве селективных использовали маркеры доминантного типа, прекрасно изученные на векторной системе pSV2 (см. 13.3.4), — гены *neo*, *gpt*, *cat*. Оказалось, что плазмиды такого типа эффективно реплицируются в ядрах клеток и стабильно поддерживаются в них длительное время. Причем латентное состояние этих плазмид наблюдается в широком спектре культур клеток не только человека, но и других млекопитающих.

Челночные плазмиды на основе генетических элементов EBV могут быть использованы для клонирования и экспрессии генов в культурах клеток человека в целях получения белковых продуктов, максимально соответствующих природным белкам человека. Они позволяют также исследовать влияние разных культур клеток на уровень экспрессии клонированных генов и природу продуцируемых ими полипептидов (конформацию, посттрансляционную модификацию, специфический транспорт и др.). Мутагенез генов и экспрессия этих измененных вариантов в составе EBV-векторов позволяет проводить тонкий молекулярно-генетический анализ их функционирования.

14.5. ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ ПОКСВИРУСОВ

Поксвирусы образуют большое семейство Poxviridae, представители которого патогенны как для позвоночных (подсемейство Chordopoxviridae), так и беспозвоночных (подсемейство Entomopoxviridae). Это самые крупные и сложно организованные вирусы. В последние годы поксвирусы позвоночных, особенно представители рода *Orthopoxvirus*, привлекают пристальное внимание исследователей как молекулярные векторы для создания живых вакцин против различных заболеваний человека и животных. Род *Orthopoxvirus* включает такие патогенные для человека виды, как вирус натуральной оспы, вирус оспы обезьян и вирус оспы коров. Наиболее активно изучается вирус осповакцины (VAC), который с большим успехом был использован в качестве живой вакцины при реализации программы глобального искоренения оспы на земном шаре. В последнее время спектр поксвирусов, на основе которых разрабатываются живые поливалентные вакцины, расширяется. Однако до сих пор не решен ряд принципиальных вопросов. Ортопоксвирусы имеют относительно широкий круг чувствительных животных, содержат неидентифицированные гены патогенности и способны эффективно рекомбинировать с другими поксвирусами, циркулирующими в природе. Это может приводить к непредсказуемым последствиям — возникновению высокопатогенных ортопоксвирусов с широким кругом хозяев. Например, в первой половине 2003 г. произошли массовые вспышки инфекционных заболеваний людей, обусловленных вирусами оспы коров (Бразилия) и оспы обезьян (США).

Только подробное исследование структурно-функциональной организации генома ортопоксвирусов, а также других членов семейства Poxviridae позволит выявить гены, контролирующие свойства патогенности и детерминирующие круг хозяев вирусов, установить эволюционные взаимосвязи поксвирусов и границы изменчивости их конкретных генов. Поэтому большие усилия исследователей направлены на картирование генов данных вирусов и определение их функций. Приоритет в секвенировании и анализе структурно-функциональной организации полных геномов вирусов натуральной оспы, оспы обезьян и оспы коров принадлежит группе исследователей Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор», руководимой С. Н. Щелкуновым.

14.5.1. *Структура вириона и генома ортопоксвирусов*

У поксвирусов, в отличие от других вирусов животных, рассматриваемых в данной книге, жизненный цикл проходит в цитоплазме клетки

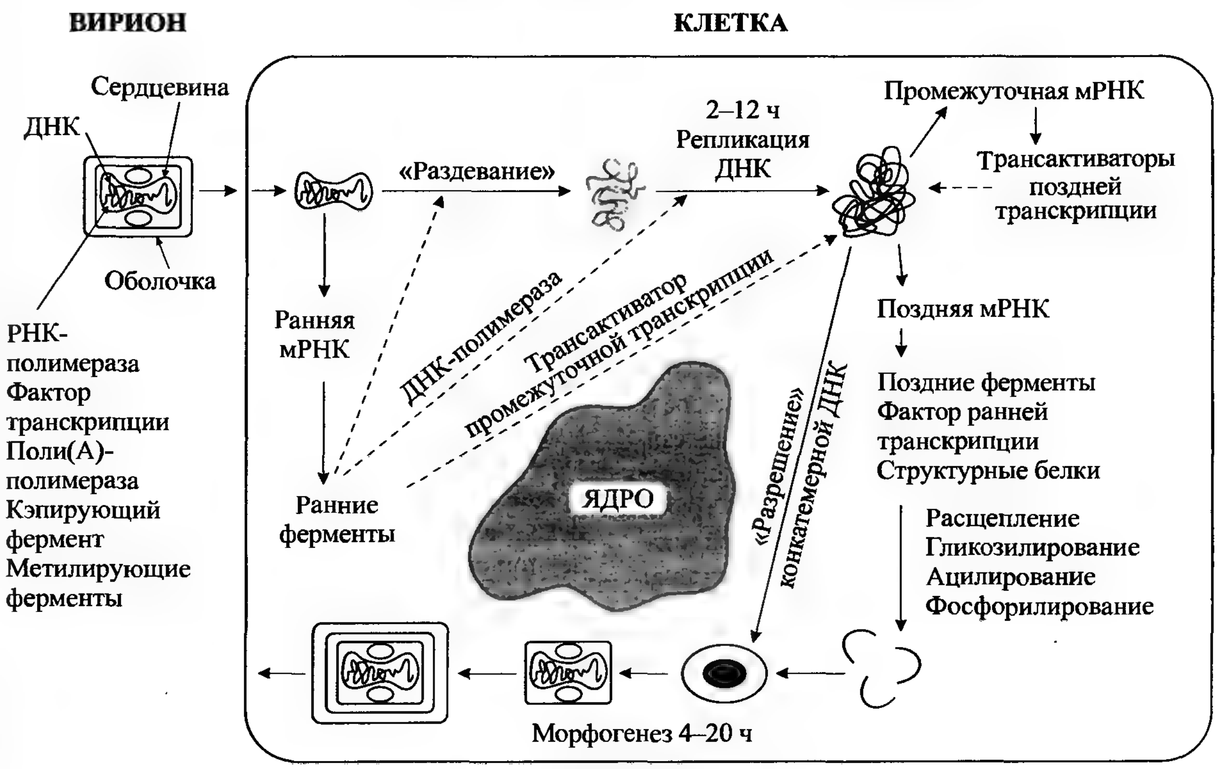


Рис. 14.29. Цикл репродукции вируса осповакцины

в значительной степени автономно от ядра (рис. 14.29). В связи с этим поксвирусы должны иметь собственные ферментные системы синтеза РНК и ДНК. Установлено, что инфекционные частицы поксвирусов содержат в своем составе полную ферментную систему транскрипции, способную синтезировать функциональную мРНК в полиаденилированной, кэпированной и метилированной форме. В настоящее время для многих ферментов показано, что они кодируются вирусным геномом. Участок цитоплазмы клетки, где происходит репликация и сборка вирусных частиц, называют виросомой, вирусной фабрикой или вироплазмой.

В тканевой культуре большинство инфекционных частиц ортопоксвирусов в конце цикла развития остается внутри клеток. Вирионы зрелого внутриклеточного вируса (intracellular mature virus, IMV) состоят из сложно организованной двояковогнутой сердцевины, окруженной мембраной, и боковых (латеральных) тел, расположенных в местах вогнутостей. Сердцевину и боковые тела покрывает поверхностная мембрана. Таким образом, частицы IMV содержат две мембранные структуры (рис. 14.30). Методом двумерного электрофореза в составе таких вирионов обнаруживается более 100 полипептидов.

В зависимости от штамма вируса и типа инфицированных клеток от 1 до 30 % вирусных частиц покидает клетку. При этом образуется промежуточная форма внутриклеточных вирионов, покрытых дополнительной двойной мембраной, т. е. такие вирусные частицы содержат четыре мембранные структуры (см. рис. 14.29). При выходе вирионов из клетки внешняя мембрана сливается с плазматической мембраной клетки. Поэтому вирионы внеклеточного вируса (extracellular enveloped virus, EEV) имеют по сравнению с IMV одну дополнительную липопротеиновую оболочку. Данная оболочка содер-

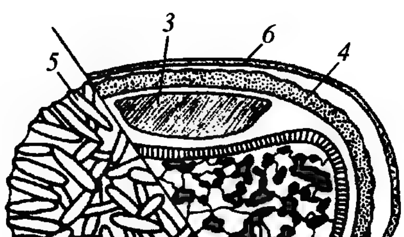


Рис. 14.30. Структура вириона ортопоксвирусов:

1 — сердцевина; *2* — мембрана сердцевины; *3* — боковые тела; *4* — поверхностная мембрана; *5* — трубчатые структуры поверхности инфекционного внутриклеточного вириона; *6* — оболочка инфекционного внутриклеточного вириона

жит десять полипептидов, из которых девять гликозилированы.

Геном поксвирусов представлен линейной двухцепочечной ДНК с ковалентно замкнутыми концами. Размер ДНК ортопоксвирусов варьирует от 175 до 230 тпн в зависимости от вида и штамма вируса, а их геном кодирует около 200 полипептидов. Гены по времени экспрессии делят на ранние (E), промежуточные (I), поздние (L), а также экспрессируемые в течение всего цикла развития вируса — ранне-поздние (E–L). Ранняя транскрипция происходит сразу после вхождения вириона в клетку и осуществляется вирион-ассоциированной РНК-полимеразой. С промежуточных промоторов транскрипция инициируется только после репликации вирусной ДНК, но в составе гибридных плазмид I-гены могут транскрибироваться без предшествующей репликации ДНК. Для транскрипции поздних генов необходима не только предшествующая репликация вирусной ДНК, но и экспрессия ранних и промежуточных генов. Кодирующие последовательности генов данных цитоплазматических вирусов непрерывны, и сплайсинг отсутствует.

14.5.2. Конструирование гибридных вирусов осповакцины

С развитием методов генетической инженерии вирус осповакцины с новой силой привлек к себе внимание исследователей. Прежде всего это было связано с заманчивой идеей получать на основе VAC рекомбинантные живые поливалентные вакцины. Поскольку ДНК данного вируса имеет большой размер, прямая встройка в вирусный геном чужеродных фрагментов ДНК затруднена. Кроме того, многочисленные эксперименты доказали, что депротеинизированная («голая») ДНК поксвирусов неинфекционна. Однако поксвирусы эффективно рекомбинируют *in vivo*. К. Сэм и К. Дамбелл в 1981 г. продемонстрировали, что определенный рестрикционный фрагмент ДНК VAC, введенный в клетки, инфицированные термочувствительным мутантом вируса, способен рекомбинационно встраиваться в вирусный геном, приводя к образованию вируса дикого типа. Более того, Е. Накано с соавторами (1982 г.) удалось перевести делеционный вариант VAC в вариант дикого типа за счет рекомбинационной встройки *in vivo* фрагмента ДНК, покрывающего район вирусного генома, который включал область делеции и прилегающие к ней с обеих сторон последовательности.

Данные эксперименты по спасению маркера привели к разработке общей схемы введения чужеродных фрагментов ДНК в геном ортопоксвирусов. На первом этапе конструируют гибридную плазмиду, содержащую гетерологичный ген, фланкированный последовательностями вирусной ДНК из несущественной области вирусного генома. Полученную плазмиду вводят в клетки, инфицированные вирусом. За счет рекомбинации по областям гомологии между фланкирующими последовательностями в гибридной плазмиде и вирусной ДНК происходит встройка чужеродного фрагмента в геном вируса (рис. 14.31). Образовавшееся вирусное потомство более чем на 99 % состоит из вируса исходного типа, поэтому необходим метод селекции рекомбинантных вирусов.

Наиболее популярный метод селекции рекомбинантов, предложенный в 1982 г., основан на встройке чужеродных генов в ген *tk* VAC и отборе вирусов TK^- по бляшкообразованию на монослое клеток с фенотипом TK^- в присутствии 5-бромдезоксиуридина. Недостаток этого подхода состоит в том, что в процессе селекции отбираются не только рекомбинанты, но и спонтанные мутанты TK^-. Поэтому для надежного выявления рекомбинантов требуется дополнительно проводить гибридизацию ДНК, амплификацию сегмента ДНК в полимеразной цепной реакции или иммунохимический скрининг.

Следует подчеркнуть, что чужеродные кодирующие последовательности могут быть экспрессированы в составе генома поксвирусов только в том случае, если они помещены под контроль поксвирусного промотора. Встраиваемые последовательности не должны иметь экзон-интронной структуры, так как сплайсинг у поксвирусов отсутствует. Более того, если экспрессия целевой последовательности происходит с раннего промотора ортопоксвирусов, внутри кодирующей последовательности не должно быть сигналов ранней транскрипционной терминации TTTTTNT (где N — любой нуклеотид).

Система селекции рекомбинантных вариантов TK^- вируса осповакцины существенно упростилась после того, как в лаборатории Б. Мосса (1985 г.) были созданы плазмидные векторы интеграции, обеспечивающие не только встройку целевой последовательности под контроль поксвирусного промотора, но и одновременное введение репортерного гена *lacZ* β-галактозидазы *E. coli*, соединенного с другим вирусным промотором (рис. 14.32). Добавление в среду специфичного для β-галактозидазы хромоген-

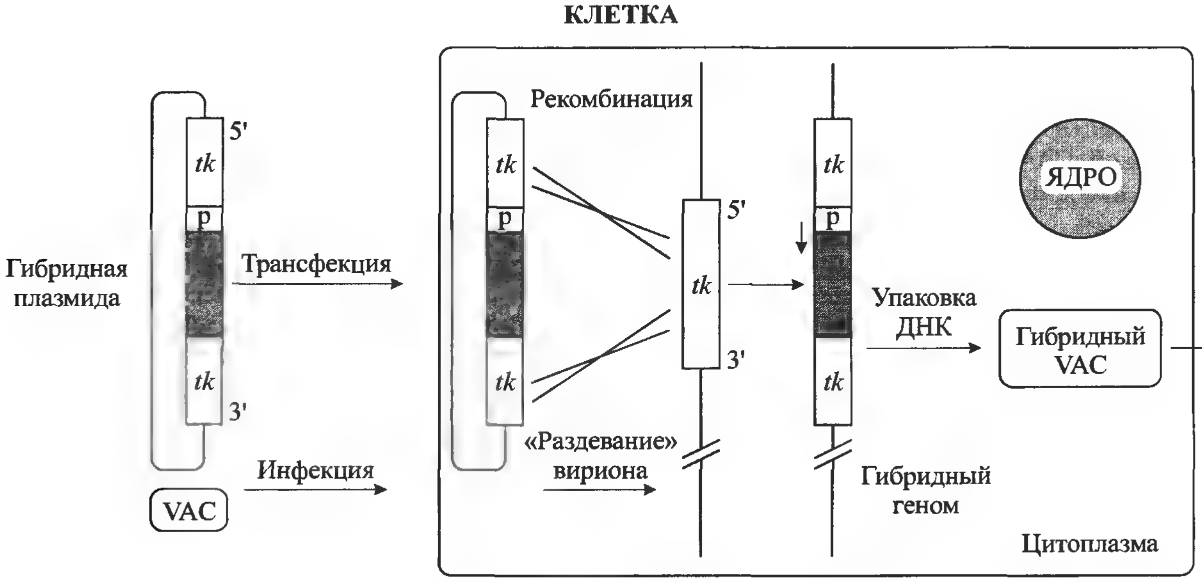


Рис. 14.31. Схема рекомбинационного получения гибридных вирусов осповакцины.

Плазмида содержит чужеродный ген (темный участок), встроенный под контроль поксвирусного промотора (p) и фланкированный фрагментами ДНК VAC из области гена *tk*, несущественного для размножения вируса в культуре клеток

ного субстрата Xgal приводит к окрашиванию бляшек таких рекомбинантных вирусов в синий цвет.

Другим фенотипическим маркером для отбора гибридных ортопоксвирусов может быть ген люциферазы светлячка. При этом следует отметить, что выявление встройки по активности люциферазы примерно в 1000 раз чувствительнее, чем по активности β-галактозидазы. Это может оказаться удобным при изучении распространения (диссеминации) рекомбинантного вируса в тканях инфицированных животных.

Фенотипический отбор рекомбинантов можно осуществлять также либо используя спасение маркера определенных мутантов VAC, либо идентифицируя мутантные клоны, возникающие в результате инсерции в целевые вирусные гены чужеродных последовательностей. Так, Х. Шида с соавторами в 1987 г. показали, что встройка экзогенных фрагментов в ген гемагглютинина VAC может быть выявлена по отсутствию адсорбции куриных эритроцитов в бляшках вариантов HA^-.

Вариант ЛИВП штамма Lister VAC на хорионаллантоисных оболочках куриных эмбрионов образует белые оспины. В лаборатории С. Н. Щелкунова продемонстрировано (1989 г.), что рекомбинант, полученный введением в состав генома гена *SPI*-2 вируса оспы коров, формирует красные геморрагические оспины. Данный ген также можно использовать в качестве фенотипического маркера для отбора рекомбинантов VAC.

Мутант по гену *A27*L VAC формирует мелкие бляшки. Поэтому, как показали Дж. Родригес и М. Эстебан в 1989 г., используя данный ген в качестве фенотипического маркера и мутантный вирус по данному гену (мелкобляшечный фенотип), можно вести отбор по размеру бляшек (у рекомбинанта они будут крупные).

В лаборатории Э. Пэолетти установлено, что делеция гена *K1*L VAC приводит к тому, что вирус теряет способность реплицироваться на линии клеток человека MRC-5. Введение данного гена в геном мутантного вируса позволяет на культуре MRC-5 эффективно селектировать рекомбинанты (1989 г.).

Более совершенным является подход, основанный на встройке в вирусный геном доминантного селективного маркера одновременно с целевым геном. При этом встройка может происходить в любом несущественном для жиз-

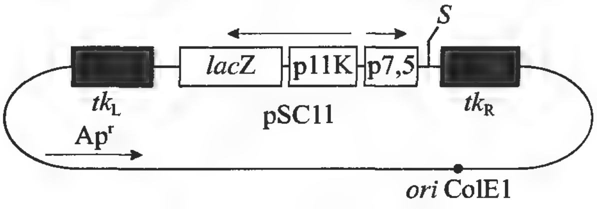


Рис. 14.32. Схема плазмиды pSC11.

S — сайт рестриктазы *Sma*I, по которому можно осуществлять встройку целевого гена; tk_L и tk_R — фланкирующие сегменты нарушенного в результате встроек гена тимидинкиназы VAC. Стрелками обозначено направление транскрипции с позднего промотора p11K и раннепозднего промотора p7,5

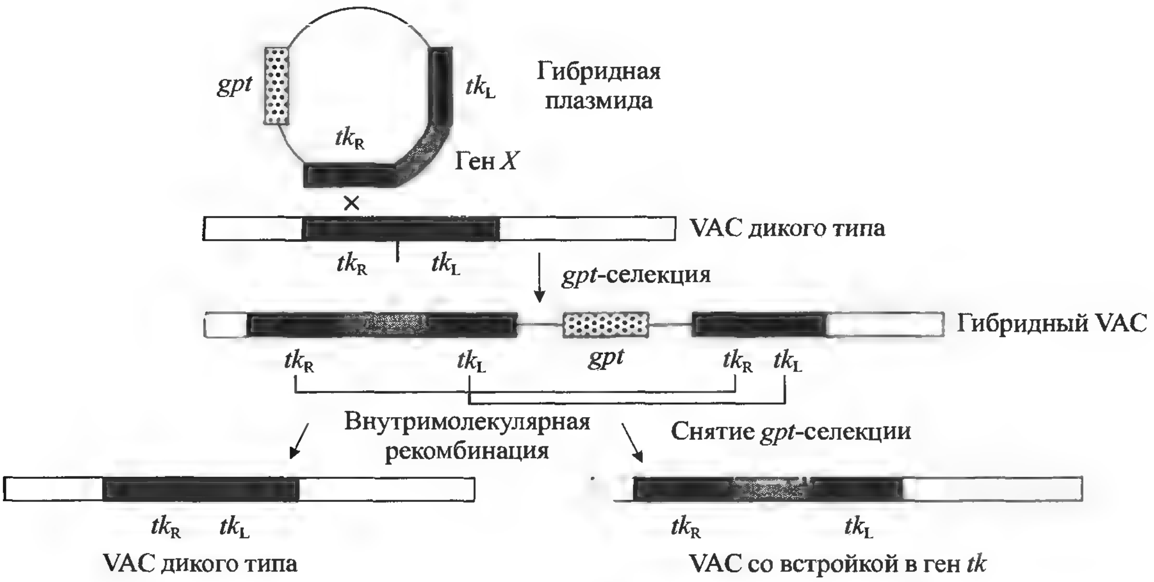


Рис. 14.33. Схема метода временной доминантной селекции

недеятельности вируса участке генома, и нет необходимости использовать какие-либо мутанты вируса и/или специфические культуры клеток. В качестве маркера доминантного типа в лаборатории Д. Храби в 1985 г. опробовали ген, обеспечивающий устойчивость к неомицину. Однако эта система была не очень эффективной, так как в условиях селекции рост исходного вируса подавлялся лишь на 98 %, т. е. среди вирусного потомства наряду с рекомбинантами всегда имелся исходный вирус.

Это неудобство удалось преодолеть благодаря использованию гена *gpt* ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы *E. coli*, предложенному независимо двумя лабораториями в 1988 г. На селективной среде с микофеноловой кислотой образуют бляшки только рекомбинантные VAC, экспрессирующие *gpt* (о системе селекции см. 13.3.4). Недостатком этого подхода является то, что ген *gpt* при встройке в вирусный геном можно использовать лишь один раз. Но в ряде случаев возникает необходимость встроить два или более чужеродных гена в разные участки генома VAC (например, при создании поливалентных живых вакцин). Поэтому в 1990 г. в лаборатории Б. Мосса был предложен метод обратной селекции ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы в составе VAC для исключения из вирусного генома гена *gpt* при сохранении другого встроенного гена. Метод основан на том, что на линии мышиных фибробластов, дефектных по гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазе, в присутствии нуклеотидного аналога 6-тиогуанина формировать бляшки способен лишь VAC, у которого отсутствует экспрессируемый ген *gpt* (включение 6-тиогуанина в ДНК приводит к гибели вируса). Таким образом, можно последовательно вводить целевые гены совместно с *gpt*, затем этот ген удалять и снова совместно с ним вводить следующий целевой ген в другую область генома VAC.

Чтобы избавиться от такой многоступенчатости, в той же лаборатории разработали иной подход к получению и селекции рекомбинантных вирусов осповакцины, который оказался очень удобным и универсальным для введения инсерций, делеций или мутаций в любую область вирусного генома. В данном случае доминантный маркер *gpt* находится в гибридной плазмиде вне фрагмента вирусной ДНК, и поэтому он может включиться в вирусный геном только в результате одиночного кроссинговера (рис. 14.33), при котором интегрируется вся гибридная плазмида, а не только вирусный сегмент. (Интеграция из плазмиды «чистого» вирусного фрагмента является результатом двойного кроссинговера.) Структура генома рекомбинантного вируса, в который встроена вся плазмида, нестабильна из-за наличия протяженных тандемных повторов (например tk_R или tk_L, см. рис. 14.33), и при снятии селективного давления по гену *gpt* в результате внутримолекулярной рекомбинации плазмидная часть с геном *gpt* исключается с высокой эффективностью, а чужеродный целевой ген или вводимое мутационное изменение сохраняется в составе стабильного варианта VAC. Этот метод получил название ***временной доминантной селекции***. Используя данный метод, в лаборатории

С. Н. Щелкунова (2001–2003 г.) в геном вируса оспы коров последовательно ввели делеции по пяти различным генам.

В 1992 г. в двух лабораториях независимо описали прямую встройку чужеродных фрагментов ДНК в геном VAC методом лигирования *in vitro*. По уникальным сайтам рестриктаз *Sma*I или *Not*I *in vitro* встраивали чужеродный фрагмент, вводили лигазную смесь в клетки, инфицированные вирусом-помощником (ДНК поксвирусов неинфекционна), а затем в вирусном потомстве отбирали рекомбинантные варианты VAC. Ф. Шейфлингер с соавторами в качестве вируса-помощника использовали гетерологичный вирус оспы птиц, который способен размножаться на ограниченном числе культур клеток, в то время как VAC имеет очень широкий круг чувствительных культур. Упаковку в вирионы ДНК VAC после реконструкции проводят в культуре клеток, инфицированных вирусом оспы птиц, а затем потомство титруют на культуре клеток, пермиссивных лишь для VAC. М. Мерхлинский и Б. Мосс в качестве помощника предложили термочувствительный мутант VAC *ts*42, дефектный по репликации ДНК и гомологичной рекомбинации при непермиссивной температуре (40 °С). Следует отметить, что широкого распространения данный подход не получил.

Как видим, методология конструирования гибридных ортопоксвирусов, и прежде всего VAC, разработана очень хорошо. Это позволяет получать самые различные варианты рекомбинантных вирусов.

Наиболее важным направлением в генетической инженерии VAC является создание живых рекомбинантных вакцин, т. е. гибридных вирусов, экспрессирующих гены основных антигенных детерминант других микроорганизмов. Такие вакцины обычно имеют значительные преимущества перед инактивированными (убитыми) вакцинами, так как обеспечивают более полноценный иммунный ответ на вирусные антигены (см. 17.3). Вирус осповакцины имеет широкий круг хозяев, что позволяет применять вакцины на его основе для разных видов животных в ветеринарии, а также при некоторых эпидемических ситуациях в медицине. VAC успешно использовали для массовой вакцинанции людей против оспы в течение многих лет. После 1980 г. в связи с глобальной ликвидацией оспы вакцинация против этой инфекции прекращена, так как риск осложнений, возникающих с определенной, хотя и небольшой, частотой при такой вакцинации, не оправдан. Следует отметить, что инактивация в результате встройки целевых генов таких локусов VAC, как гены тимидинкиназы, гемагглютинина и др., приводит к снижению вирулентных свойств вируса. Поэтому гибридные VAC в большинстве случаев должны быть аттенуированными по отношению к исходному вирусу. Данному вопросу уделяется большое внимание, прорабатываются и различные альтернативные варианты. Так, в 1992 г. в лаборатории Э. Пэолетти предложили использовать в качестве молекулярного вектора при создании живых поливалентных вакцин вирус оспы канареек, который не реплицируется в клетках млекопитающих, но обеспечивает после вакцинации экспрессию целевых генов и иммунный ответ на их белковые продукты.

В последние годы в качестве безопасного вектора активно изучают штамм вируса осповакцины MVA, полученный германскими учеными в результате множественных пассажей VAC на куриных эмбрионах в 1970-х гг. Штамм MVA является высокоаттенуированным вариантом вируса осповакцины, он способен *in vitro* размножаться на культурах клеток птиц, но практически не размножается в клетках млекопитающих. Тем не менее при вакцинации экспериментальных животных или людей рекомбинантными вариантами VAC штамма MVA наблюдается эффективный иммунный ответ против целевых белков, чьи гены встроены в вирусный геном. Получаемые рекомбинантные MVA не вызывают побочных реакций при введении экспериментальным животным в очень высоких дозах. Предполагается, что VAC штамма MVA можно будет использовать в качестве вектора для вакцинации даже иммунодефицитных людей.

Экспериментальная проверка показала, что в геном VAC можно интегрировать не менее 25 тпн чужеродной ДНК. Геном такого гибридного вируса при пассировании стабильно сохраняет свою структуру. Поэтому на основе VAC можно создавать поливалентные живые вакцины, т. е. варианты вируса, продуцирующего одновременно антигенные детерминанты нескольких инфекционных агентов.

Многочисленные исследования демонстрируют успешное использование вируса осповакцины в качестве вектора для конструирования эффективных живых вакцин против различных вирусных инфекций (табл. 14.1).

Многообещающим направлением является создание генов искусственных полиэпитопных полипептидов, состоящих из определенным об-

Таблица 14.1. **Примеры защиты лабораторных животных от инфекций путем вакцинации гибридными вирусами осповакцины**

Источник встроенного в VAC гена	Экспрессируемый гибридным VAC чужеродный белок	Животные
ДНК-вирусы:		
цитомегаловирус	pp89	Мышь
Эпштейна–Барр	gp340	Мартышка
гепатита B	S-антиген	Шимпанзе
простого герпеса 1	gB	Мышь
	gD	Мышь
простого герпеса 2	gD	Морская свинка
псевдобешенства	gp50	Мышь, свинья
РНК-вирусы:		
Дэнге	Структурный	Мышь
гриппа A	HA	Хомяк, мышь, цыпленок, хорек
	NP	Мышь
	NA	Цыпленок
гриппа B	HA	Мышь
лейкемии мышей Фрейнда	Env	Мышь
Т-клеточной лейкемии человека	Env	Кролик
лихорадки Ласса	N, G	Морская свинка, мартышка
клещевого энцефалита	C, M, E, NS1, NS2, NS3	Мышь
лимфоцитарного хориоменингита	G, NP	Мышь
кори	HA, F	Мышь
парагриппа 3	F, HN	Мартышка
парагриппа SV5	F, HN	Хомяк, кролик
бешенства	G	Мышь, лиса, кролик, скунс, енот, собака, кошка
желтой лихорадки	NS1, NS2a, NS2b	Мышь
везикулярного стоматита	G, E1, E2	Мышь, корова
чумы рогатого скота	HA, F	Корова, кролик
респираторно-синцитиальный	F, G	Хлопковая крыса, мышь
Бактерии		
стрептококк A	M6	Мышь

разом уложенных антигенных детерминант разных иммуногенных белков выбранного инфекционного агента. Экспрессия таких генов в составе VAC при вакцинации может приводить к развитию эффективного иммунного ответа против целевого микроорганизма. Важное значение при этом играет первый этап планирования экспериментов — компьютерный дизайн искусственного иммуногенного белка. В качестве примера рассмотрим исследование, инициированное А. М. Ерошкиным. В результате анализа данных литературы и компьютерного моделирования им была составлена последовательность неприродного полипептида TBI (от англ. T- and B-cellular immunogen), включающего T- и B-клеточные антигенные детерминанты белков ENV и GAG вируса иммунодефицита человека HIV-1 (рис. 6 на цв. вклейке). Для данного неприродного белка синтезировали кодирующую последовательность ДНК и экспрессировали ее в клетках *E. coli*. У мышей, иммунизированных рекомбинантным белком TBI, был обнаружен как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ против вируса иммунодефицита человека.

Учитывая, что VAC является эффективным индуктором T- и B-клеточного иммунного ответа, т. е. фактически выполняет роль адъюванта, в лаборатории С. Н. Щелкунова создали рекомбинантный TK^- вирус осповакцины VR18V312, экспрессирующий химерный белок TBI–HBsAg, в котором последовательность TBI состыкована с N-концом поверхностного антигена вируса гепатита B. Такой химерный белок был спланирован исходя из предположения, что он, как и HBsAg, будет способен образовывать надмолекулярные структуры, повышающие иммуногенные свойства TBI.

Иммуногенные свойства полученного штамма VR18V312 изучали при однократном подкожном или внутрикожном введении мышам линии BALB/c в дозе $1 \cdot 10^6$ БОЕ на жи-

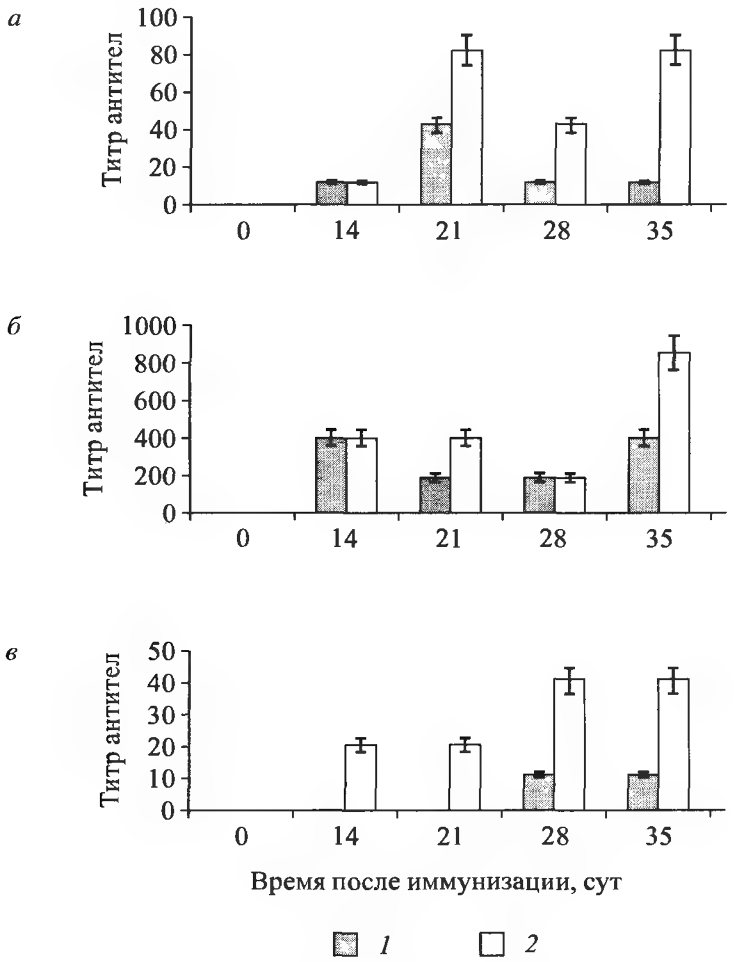


Рис. 14.34. Динамика образования антител к белкам вируса иммунодефицита человека (*а*), осповакцины (*б*) и к HBsAg (*в*) в сыворотке крови мышей, иммунизированных рекомбинантным VAC VR18V312:

1 — подкожный, *2* — внутрикожный способы иммунициации

вотное (2002 г.). Данные по динамике биосинтеза антител (рис. 14.34) демонстрируют, что более выраженный гуморальный иммунный ответ развивался при внутрикожном способе иммунизации. При этом наблюдался синтез антител против антигенов всех трех целевых агентов: вируса иммунодефицита человека типа 1, вирусов гепатита В и осповакцины. Синтезируемые экспериментальными животными антитела нейтрализовали биологическую активность как HIV-1, так и ортопоксвирусов. Интересно отметить, что клеточный иммунный ответ против антигенов изучаемых вирусов не зависел от способа иммунизации (рис. 14.35). Таким образом, рекомбинантный вирус осповакцины VR18V312 можно рассматривать в качестве кандидатной живой поливалентной вакцины одновременно против вирусов иммунодефицита человека, гепатита В и ортопоксвирусов.

Большое значение методы конструирования рекомбинантных VAC имеют для выяснения функций многочисленных генов этого сложно организованного вируса, дискриминации между существенными или несущественными для его развития генами. Особый интерес представляет элегантная схема получения зависимых от индуктора условно летальных мутантов ортопоксвирусов, предложенная в лаборатории Дж. Смита в 1990 г. В состав изучаемого гена VAC между промотором и кодирующей последовательностью встраивают операторный участок *lac*-оперона *E. coli*. В другую область вирусного генома вводят ген белка репрессора *lacI* *E. coli*, находящийся под контролем конститутивного поксвирусного промотора. В присутствии ИПТГ — индуктора лактозного оперона *E. coli* — целевой вирусный ген нормально экспрессируется. При удалении же из среды ИПТГ происходит эффективное подавление экспрессии вирусного гена за счет связывания репрессора с операторным участком на геноме (рис. 14.36). Такой подход позволяет включать

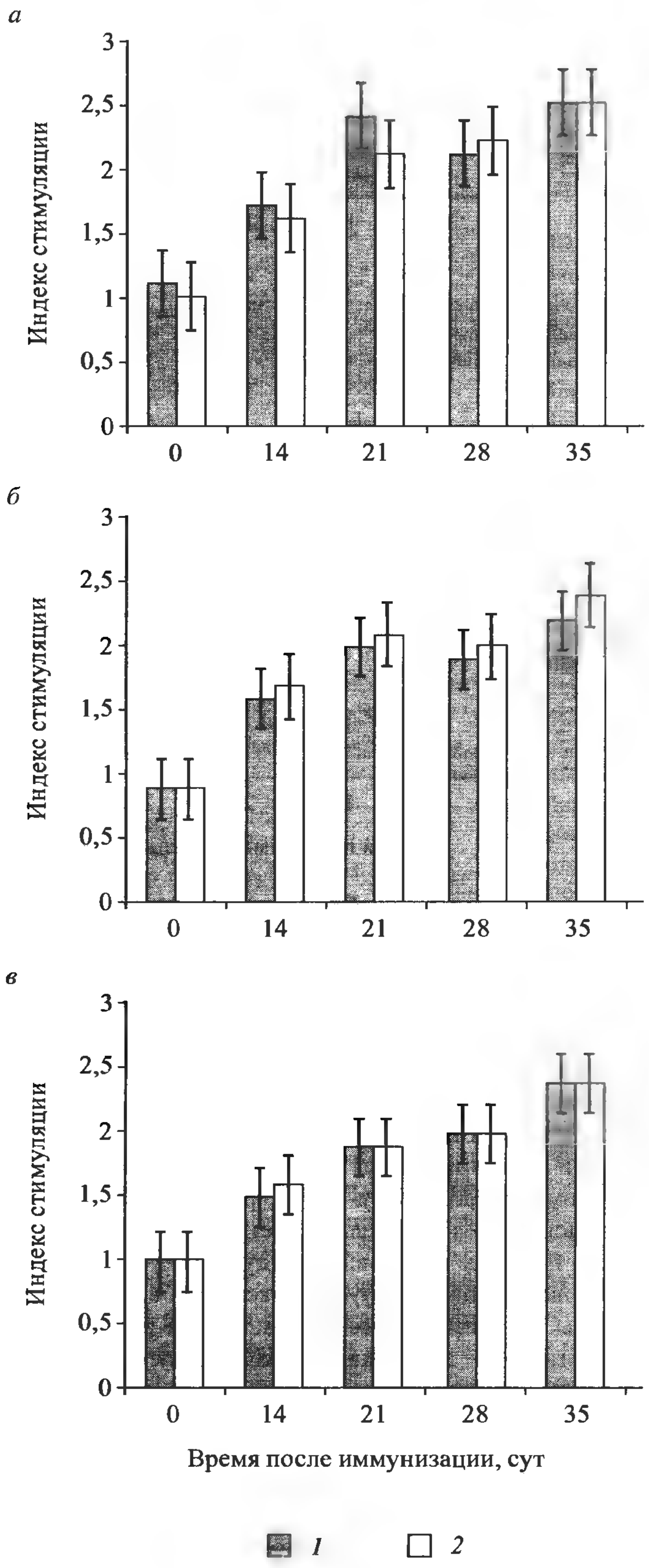


Рис. 14.35. Динамика клеточного иммунного ответа у мышей, иммунизированных рекомбинантным VAC VR18V312:

а — индукция бласттрансформации антигенами вируса иммунодефицита человека, *б* — вируса осповакцины, *в* — поверхностным антигеном вируса гепатита В; *1* — подкожный, *2* — внутрикожный способы иммунизации

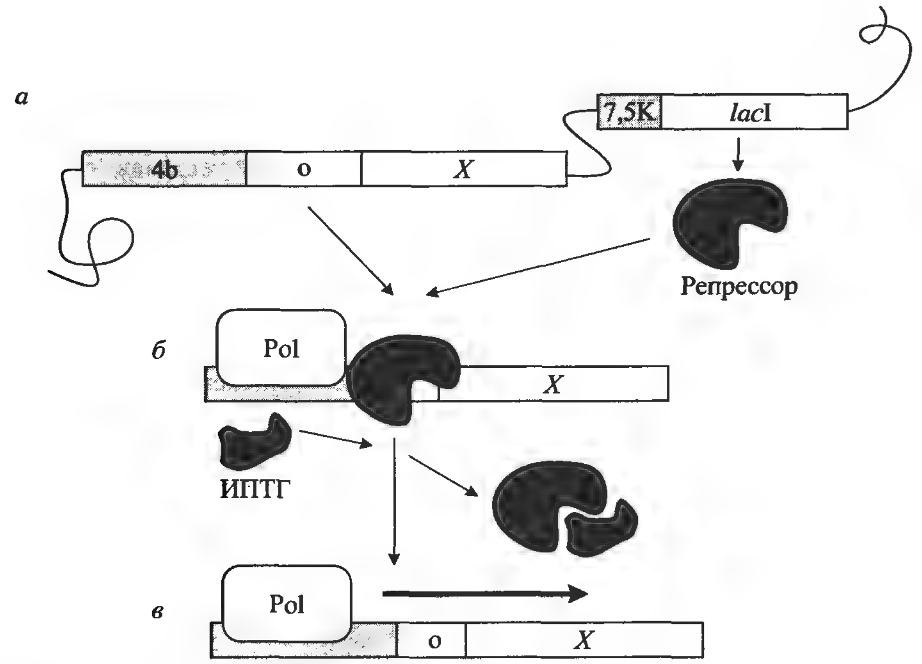


Рис. 14.36. Индуцибельная экспрессия гена в составе генома вируса осповакцины:

а — схема генома гибридного VAC; *б* — репрессия, *в* — индукция транскрипции целевого гена *X*. *lac*I — ген белка репрессора; o — операторный район лактозного оперона *E. coli*; Pol — РНК-полимераза VAC; 4b — промотор позднего гена структурного белка 4b, 7,5K — ранне-позднего гена белка 7,5K

или выключать экспрессию гена VAC в любое время и изучать, как это влияет на репликацию и морфогенез вируса.

Для экспрессии чужеродных генов в составе VAC используют разнообразные поксвирусные промоторы. Система транскрипции, направляемой РНК-полимеразой фага T7, также адаптирована для VAC. Оказалось, что если использовать промотор и терминатор гена *Ф10* фага T7, а также конститутивно экспрессировать ген *1* РНК-полимеразы фага T7, то происходит интенсивная транскрипция целевой последовательности в ДНК VAC. Однако уровень синтеза целевого белка при этом возрастает заметно меньше ожидаемого. Это связано с тем, что бóльшая часть молекул мРНК, синтезируемых РНК-полимеразой фага T7, остаются некэпированными и не используются рибосомами для синтеза белка. Известно, что мРНК пикорнавирусов имеет длинную нетранслируемую 5′-концевую (лидерную) область (untranslated leader region, UTR), которая обеспечивает кэп-незави-

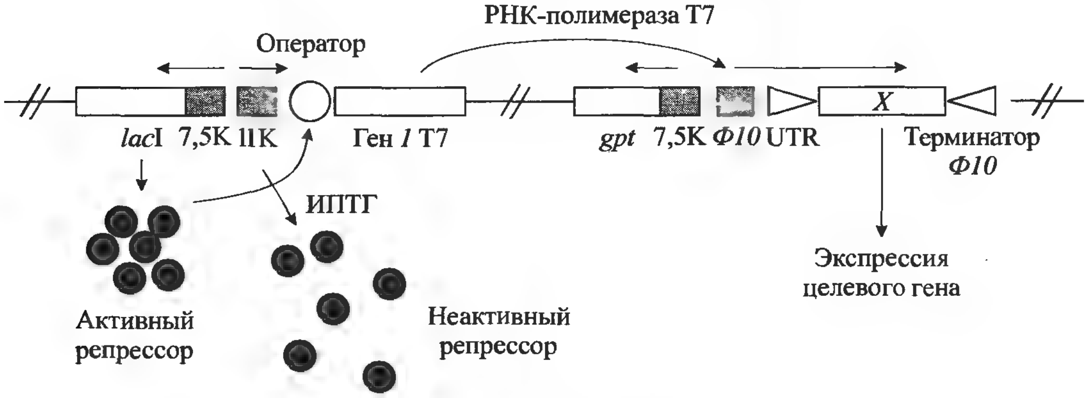


Рис. 14.37. Схема генома гибридного вируса осповакцины, обеспечивающего высокоэффективную экспрессию чужеродного гена.

X — целевой ген; *Ф10* — поздний ген фага T7; UTR — ДНК-копия 5′-концевой нетранслируемой области РНК вируса энцефаломиокардита. Серыми прямоугольниками обозначены промоторы, прямыми горизонтальными стрелками — направления транскрипции.

Левый блок генов встроен в ген тимидинкиназы, правый — в ген гемагглютинина (ha) VAC

симое связывание рибосом с этой РНК. Поместив кДНК сегмента, соответствующего UTR РНК вируса энцефаломиокардита, сразу после промотора фага T7, удалось увеличить синтез чужеродного белка гибридным VAC на порядок. В итоге в лаборатории Б. Мосса была предложена система регулируемой высокоэффективной экспрессии чужеродных генов (рис. 14.37).

14.5.3. Использование гибридных поксвирусов для вакцинации домашних и диких животных

Как отмечалось выше, вирус осповакцины имеет широкий круг чувствительных животных. Поэтому гибриды на его основе можно использовать в качестве живых вакцин против различных инфекций разных видов животных. Важным достоинством поксвирусов также является их высокая устойчивость, по сравнению с другими вирусами, к воздействию внешних физических факторов, например температуры.

Впечатляющие результаты получены при использовании гибридного VAC, экспрессирующего поверхностный гликопротеин G вируса бешенства. Во многих европейских странах и в Канаде основным природным резервуаром вируса бешенства являются лисы, от которых заражаются домашние животные и человек. В США главные естественные носители вируса бешенства — еноты и скунсы. Лабораторные эксперименты показали, что при введении лисам гибридного VAC вместе с кормом происходит вакцинация животных и вырабатывается надежный иммунитет против бешенства. На основании этих результатов в Швейцарии и некоторых других странах провели масштабные эксперименты: в местах обитания лис разбрасывали пищевые приманки, содержащие живой гибридный вирус осповакцины. В результате значительно сократилось число лис, зараженных вирусом бешенства, что привело к радикальному снижению заболеваемости домашних животных и человека в этих районах.

Недостатком данного подхода является то, что человек также восприимчив к VAC, поэтому использование VAC в широких масштабах для вакцинации диких и домашних животных может приводить к заражению человека с нежелательными последствиями. По этой причине в США в качестве молекулярного вектора для борьбы с бешенством предложено использовать вирус оспы енотов.

Большое внимание уделяется разработке ветеринарных живых вакцин на основе таких поксвирусов, как вирус оспы птиц (род *Avipoxvirus*) для птицеводства и вирус болезни Орф (род *Parapoxvirus*) для овцеводства. Полученные результаты показывают перспективность данного направления исследований для повышения продуктивности животноводства и птицеводства.

14.6. ТРАНСДУКЦИЯ ГЕНОВ С ПОМОЩЬЮ РЕТРОВИРУСОВ

Ретровирусы обладают рядом уникальных свойств, что обусловило активное использование их в последние годы в качестве молекулярных векторов. Относительно небольшой геном ретровирусов позволяет довольно просто с ним манипулировать и вводить в его состав чужеродные гены. При этом нет жестких ограничений на размер генома, упаковываемого в вирион, и поэтому удается встраивать экзогенные фрагменты ДНК длиной до 10 тпн. Ретровирусная инфекция обычно приводит к стабильной интеграции единственной копии вирусного генома в ДНК клетки-хозяина. Данные вирусы можно легко нарастить в культуре клеток до высокого титра. Ретровирусы способны инфицировать как эмбрионы, так и кроветворные клетки, причем эффективность инфицирования очень велика и достигает в эксперименте практически 100 %. Ретровирусы содержат мощные усилители транскрипции, которые обеспечивают высокий уровень экспрессии клонированных генов в клетках различных типов.

Семейство Retroviridae объединяет самые разнообразные вирусы. Некоторые из них способны приводить к образованию злокачественных опухолей, но многие не вызывают каких-либо клинически выраженных заболеваний. В единую классификационную группу их объединяет лишь способ репродукции.

14.6.1. Молекулярно-генетическая организация ретровирусов

В состав вирионов ретровирусов входят 5–8 различных полипептидов, в том числе 1–3 гликопротеина оболочки. Внутри капсида имеются несколько десятков молекул обратной транскриптазы, молекулы тРНК и две идентичные геномные одноцепочечные молекулы РНК длиной от 3,5 до 9 тыс. нуклеотидов (уникальный случай диплоидного вирусного генома).

В процессе инфекции на геномной РНК ретровируса с помощью ревертазы синтезируется двухцепочечная ДНК-копия, которая затем интегрируется в геном клетки, формируя так на-

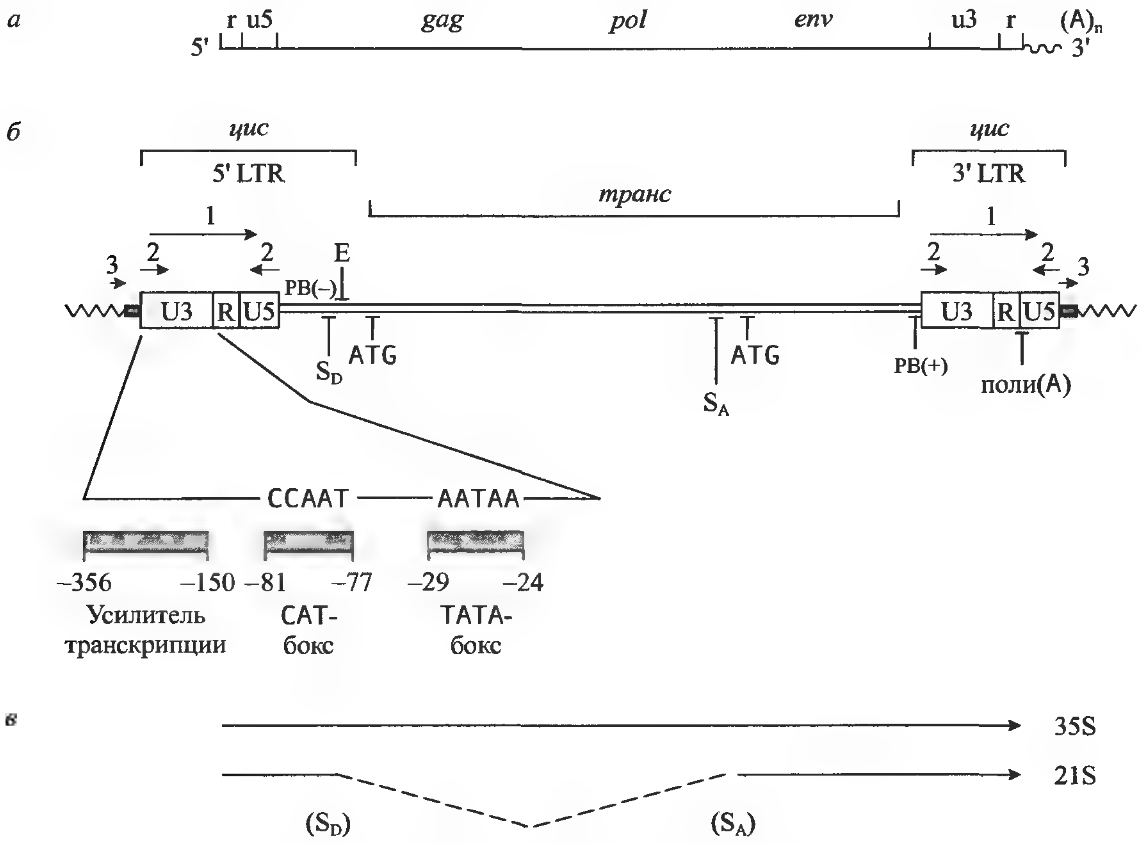


Рис. 14.38. Структура геномной РНК ретровируса (*а*), ДНК провируса (*б*) и единиц ее транскрипции (*в*) на примере вируса лейкемии мышей Молони.

u5 — уникальная 5′-концевая, u3 — 3′-концевая последовательности; r — геномная концевая избыточность. 1 — длинные прямые концевые повторы (LTR); 2 — короткие инвертированные повторы; 3 — короткая прямая дупликация, генерируемая в хромосомной ДНК при интеграции вирусной ДНК; E — участок на вирусной РНК, необходимый для ее упаковки в капсид; поли(А) — сигнал полиаденилирования РНК; ATG — инициаторный триплет; S_D, S_A — донорный и акцепторный сайты сплайсинга вирусной РНК.

Для последовательности U3 схематично представлены элементы инициации транскрипции молекул РНК с провирусной ДНК. Прямыми скобками отмечены участки, необходимые в *цис*- и *транс*-положении для жизнедеятельности ретровируса. Ломаной штриховой линией (*в*) отмечен сплайсируемый район полноразмерной вирусной РНК

зываемый ***провирус***. Для инициации синтеза молекулы ДНК на вирусной РНК необходим праймер, роль которого выполняют определенные тРНК. Такой тРНК-праймер связывается со специфичным участком PB(–) (от англ. primer binding site) в 5′-концевой области вирусной РНК. С ним взаимодействует ревертаза и инициирует синтез так называемой минус-цепи молекулы ДНК. На синтезированной цепи (–)ДНК с участка PB(+) инициируется синтез второй комплементарной плюс-цепи ДНК (рис. 14.38, *б*). Молекулы двухцепочечной вирусной ДНК синтезируются в клетке по довольно сложному механизму, приводящему к формированию на 5′- и 3′-конце прямых длинных концевых повторов U3-R-U5, обозначаемых LTR (от англ. long terminal repeats). Такие молекулы ДНК до момента интеграции находятся в ядре клетки в автономном состоянии в линейной или кольцевой форме. В процессе интеграции вирусной ДНК происходит дупликация хромосомной последовательности из 4–6 пн, в результате чего провирусная ДНК оказывается фланкированной короткими прямыми повторами, специфичными для каждого конкретного места интеграции. Таким образом, структура провирусной ДНК ретровирусов полностью соответствует общей схеме строения транспозонов.

В геноме недефектных ретровирусов выявлены три общие генетические единицы (см. рис. 14.38, *а*): *gag* (group specific antigen) кодирует большой белок-предшественник всех основных структурных белков вирусной сердцевины (кора), *pol* — ревертазу, *env* (envelope proteins) — гликопротеины оболочки вирусной частицы. В геноме онкогенных ретровирусов присутствует ген клеточного происхождения *onc* (или *src*), который ответствен за неопластическую трансформацию клеток хозяина. Ретровирусы — единственная известная группа виру-

сов, трансформирующие гены которых несущественны для репликативных или структурных функций вируса.

На этапе адсорбции круг хозяев вируса ограничивается теми клетками, которые продуцируют поверхностные рецепторы, взаимодействующие с белками оболочки вириона. Например, так называемый ***экотропный*** вирус лейкемии мышей Молони (Mo-MLV) инфицирует только мышиные и крысиные клетки, а ***амфотропный*** MLV имеет другой состав белков оболочки и характеризуется гораздо более широким кругом хозяев (культуры клеток различных тканей позвоночных от птиц до человека). Круг хозяев экотропного вируса можно легко расширить в результате ***псевдотипирования***, т. е. упаковки его генома в вирусные частицы, оболочка которых образована белками амфотропного вируса.

Следует отметить, что в пермиссивных для определенного ретровируса клетках после заражения поверхностные рецепторы блокируются в результате синтеза белков вирусной оболочки. Это приводит к тому, что продуктивно инфицированная ретровирусом клетка часто оказывается иммунной к суперинфицированию вирусом с тем же тропизмом.

Превратившись после интеграции в часть хромосомы клетки, провирус становится доступным для транскрипции. В LTR находятся промотор и терминатор транскрипции. С промотора 5′-концевого LTR инициируется транскрипция провирусной ДНК. При этом синтезируются полноразмерные геномные молекулы РНК, часть из которых в результате сплайсинга уменьшается (см. рис. 14.38). В процессе сплайсинга из полноразмерной РНК выщепляются последовательности генов *gag* и *pol*, и ген *env* сближается с 5′-концевой последовательностью вирусной РНК. Сегменты РНК, по которым происходит сплайсинг, называют донорным и акцепторным участками сплайсинга (соответственно S_D и S_A). Кроме того, на вирусной РНК имеется участок, необходимый в *цис*-положении для упаковки ее в нуклеокапсид. Этот участок обозначают E (от англ. encapsidation sequence) или ψ. В молекуле укороченной РНК участок E отсутствует, поэтому данный тип молекул вирусной РНК не способен упаковываться в вирусные частицы. В то время как все ДНК-содержащие вирусы при продуктивной инфекции убивают хозяйские клетки, ретровирусы из клеток отпочковываются, не вызывая их гибели.

Очищенная геномная РНК ретровирусов неинфекционна, а образуемая *in vivo* ДНК-копия этой РНК, в том числе провирусная, высокоинфекционна. Более того, фрагменты провирусной ДНК, содержащие ген *src* и один из LTR, с высокой эффективностью приводят к морфологической трансформации клеток животных.

У ряда ретровирусов в настоящее время известна полная нуклеотидная последовательность генома, что упрощает планирование экспериментов по их генно-инженерной реконструкции.

14.6.2. Ретровирусные молекулярные векторы

На начальном этапе исследований для создания гибридных ретровирусов чужеродные гены объединяли лишь с фрагментами ретровирусной ДНК, а затем по относительно сложной схеме получали гибридные вирусы. В одной из первых подобных работ Д. Солник с соавторами (1981 г.) сконструировали гибридный ретровирус, трансдуцирующий ген *tk* вируса простого герпеса. Для этого фрагмент, содержащий ген *tk* HSV-1, ковалентно пришили к фрагменту ДНК вируса саркомы мышей Харви, несущему информацию, необходимую для неопластической трансформации клеток. Такой гибридный фрагмент клонировали в составе ДНК векторного фага λ. После введения в культуру клеток мыши 3T3 молекул ДНК полученного фага λHaSV*tk5* образовались клоны трансформированных клеток. Отобранные морфологические трансформанты инфицировали ретровирусом Mo-MLV. Среди вирусного потомства выявили гибридные ретровирусы, которые обусловливали как генетическую трансформацию по признаку TK^+, так и морфологическую трансформацию. Такие вирусы возникали в результате рекомбинационного процесса *in vivo*.

По схожей схеме А. Джойнер и А. Берстейн в 1983 г. котрансформировали культуру клеток 3T3 плазмидой pMOV-3, несущей полный провирус Mo-MLV, и плазмидой pLTR.SV2*neo*, которая содержала ген *neo*, выделенный из pSV2-*neo* (см. 13.3.4) и ковалентно объединенный с 5′-концевым фрагментом ДНК Mo-MLV. В результате рекомбинации *in vivo* образовался NEO-ретровирус, который составлял небольшую часть вирусного потомства, полученного после трансфекции. Отобранные затем индивидуальные клоны клеток, устойчивые к антибиотику G-418, продуцировали значительные количества NEO-вируса. Анализ структуры ДНК гибридных ретровирусов показал, что они об-

разовались в результате рекомбинационных и делеционных событий.

Выполненные исследования демонстрируют, что при наличии подходящей системы отбора можно объединять чужеродные гены в составе бактериального вектора лишь с частью ретровирусной ДНК (такая гибридная ДНК должна содержать один из LTR ретровируса) и в системе котрансфекции клеток с ДНК вируса-помощника за счет рекомбинации и перестроек молекул ДНК *in vivo* получать инфекционные ретровирусы, эффективно трансдуцирующие чужеродные гены. Недостатками данного подхода являются непредсказуемость структуры генома формируемых гибридных ретровирусов и невозможность получить гибриды со встройкой генов, для которых отсутствуют методы селекции. В связи с этим несомненный интерес представляет разработка методологии конструирования гибридных молекул ДНК ретровирусов *in vitro*.

И. Верма с соавторами в 1982 г. одни из первых осуществили прямую встройку чужеродного гена в полную последовательность ДНК вируса саркомы мышей Молони (Mo-MSV). В ДНК Mo-MSV, клонированную в составе плазмиды pBR322, встроили фрагмент хромосомной ДНК крысы размером 7,6 тпн, содержащий полный ген гормона роста (рис. 14.39). Ген *GH* был ориентирован противоположно направлению транскрипции с промотора ретровируса. При встройке ген *src* оставался неповрежденным. Гибридную плазмиду pMSV-*GH*-1 гидролизовали рестриктазами *Bam*HI и *Cla*I и фрагменты ДНК вводили в культуру клеток фибробластов мыши 3Т3. В геноме клонов морфологически трансформированных клеток выявили последовательности гибридной ДНК Mo-MSV, содержащей ген *GH*. Хромосомный ген гормона роста крысы, стабильно интегрированный в геном клетки мыши, транскрибировался с собственного промотора, чужеродная мРНК подвергалась правильному сплайсингу, что приводило к синтезу полноценного белка. Более того, глюкокортикоиды активировали синтез этого чужеродного белка в клетках мыши с кинетикой, характерной для клеток крысы, т. е. функционировал соответствующий регуляторный элемент гена *GH*.

Недостаток данной векторной системы состоит в том, что клетки с гибридными ДНК подвергаются морфологической трансформации. Большой интерес представляет изучение экспрессии чужеродных генов в нормальных клетках животных. Для этой цели можно либо ис-

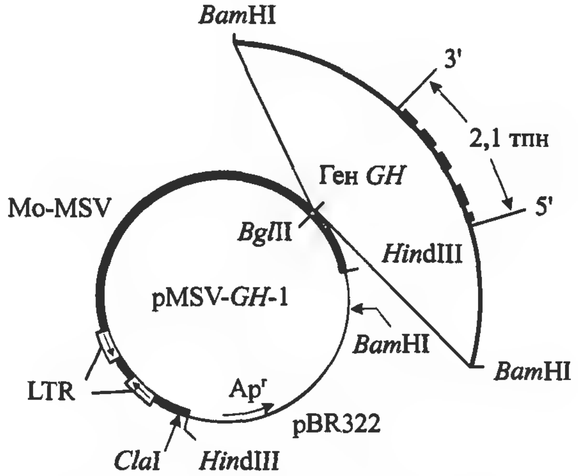


Рис. 14.39. Структура гибридной плазмиды pMSV-*GH*-1.

Сайты рестриктаз *Cla*I и *Bam*HI, по которым плазмиду гидролизовали перед введением в культуру клеток 3Т3, помечены стрелками

пользовать нетрансформирующие ретровирусы, либо осуществлять встройку так, чтобы повреждался ген *src*.

В лаборатории Х. Темина в 1981–1983 гг. была разработана система клонирования генов в составе генома вируса некроза селезенки (SNV). Использована клонированная в плазмиде ДНК провируса SNV. В различные места этой ДНК встраивали фрагмент генома HSV-1, содержащий ген тимидинкиназы. Во всех случаях после встройки гена *tk* провирусная ДНК была неинфекционна из-за нарушения каких-либо функций, но интегрировалась в геном клеток TK^-, обусловливая их генетическую трансформацию к фенотипу TK^+. При инсерционном повреждении LTR эффективность генетической трансформации была низкой, что доказывает важную роль LTR в процессе интеграции ретровирусной ДНК. Чтобы получить потомство гибридных вирусов SNV, в клетки кроме гибридной ДНК ввели котрансфекцией ДНК вируса ретикулоэндотелиоза для продукции вируса-помощника. В результате удалось получить в высоком титре потомство гибридного вируса SNV, при инфекции которым TK^--клеток цыпленка или крысы происходила их генетическая трансформация к фенотипу TK^+. Объединение в составе генома ретровируса легко селектируемого маркера генетической трансформации и любого другого гена позволяет упростить работу с гибридными ретровирусами. Данный подход успешно реализован в 1982 г. при встройке в ДНК ретровируса SNV хромосомного гена α-глобина мыши или гена *tk* вируса простого герпеса.

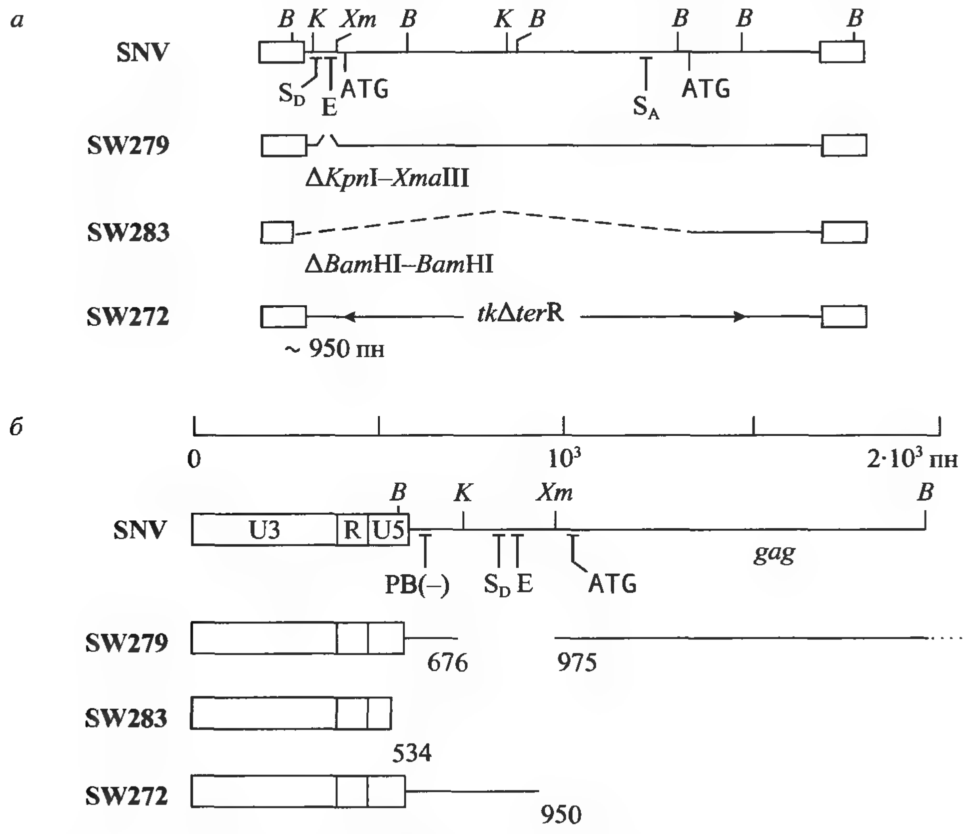


Рис. 14.40. Вирусные молекулы ДНК, использованные для создания комплементирующих линий клеток и векторных вирусов:

а — общая схема; *б* — схема, уточняющая границы делеций.
B — сайт узнавания *Bam*HI, *K* — *Kpn*I, *Xm* — *Xma*II. В SW272 встроен ген тимидинкиназы HSV-1, у которого делетирован сигнал терминации транскрипции

Недостатком предложенной векторной системы является необходимость использовать вирус-помощник, поэтому создаваемый дефектный гибридный вирус всегда находится в смеси с недефектным вирусом-помощником. Преодолеть данное затруднение удалось С. Ватанабе и Х. Темину (1983 г.), сконструировав линию клеток, комплементирующую *транс*-функции SNV (часто такие линии называют упаковывающими). *In vitro* были получены делеционные варианты клонированной провирусной ДНК SNV (рис. 14.40). В SW279 с помощью рестриктаз *Kpn*I и *Xma*III делетированы участки S_D и E, необходимые в *цис*-положении (см. рис. 14.38) для образования вирусного потомства. ДНК SW279 после введения в клетки и интеграции в геном может направлять синтез продуктов генов *gag* и *pol*. Делеция S_D делает сплайсинг вирусной РНК невозможным и поэтому предотвращает экспрессию гена *env*. В результате делеции участка E нарушается упаковка вирусной РНК в капсид.

В варианте SW283 (см. рис. 14.40) протяженная делеция затрагивает участки PB(–), S_D, S_A, E. Кодирующая последовательность гена *env* при этом состыкована с промотором 5′-концевого LTR. SW283 способен направлять лишь синтез продукта гена *env*. После котрансформации культуры клеток собаки D17 плазмидой pSV2-*neo*, несущей доминантный селективный маркер, и ДНК SW279 и SW283 получили стабильные трансформанты, содержащие эти ДНК в интегрированном состоянии. При скрининге клонов клеток, устойчивых к антибиотику G-418 (селективный маркер), обнаружены сублинии, имеющие одновременно интегрированные ДНК SW279 и SW283, не содержащие селективных маркеров.

Для проверки комплементирующих возможностей отобранных сублиний В3 и С3 в них вводили гибридную ДНК SW272, несущую в составе ДНК SNV ген тимидинкиназы HSV-1 (см. рис. 14.40). SW272 содержит все последовательности, необходимые в *цис*-положении для репликации вируса и упаковки РНК в капсид. Кроме того, SW272 имеет делецию ретровирусного генома, перекрывающуюся делециями SW279 и SW283. Это предотвращает образование и продукцию SNV дикого типа за счет го-

мологичной рекомбинации. Трансфекция клеток В3 и С3 препаратом ДНК SW272 приводила к образованию в высоком титре гибридного вирусного потомства, проявляющего при последующем инфицировании клеток TK⁻ *tk*-трансдуцирующую активность.

Сконструированные линии клеток позволяют успешно применять ретровирус SNV для клонирования чужеродных генов. Размножаемые в этой системе дефектные гибридные ретровирусы могут затем с высокой эффективностью интегрировать клонированные гены в геном инфицированных ими клеток (хотя они в этих клетках не способны размножаться). Препараты получаемых таким образом гибридных вирусов свободны от вируса-помощника и могут быть использованы для трансдукции целевых генов.

К настоящему времени наибольшее число исследований выполнено при использовании в качестве молекулярного вектора вируса лейкемии мышей. В первой работе К. Табин с соавторами (1982 г.) встроили в провирус Mo-MLV, клонированный в составе pBR322, фрагмент ДНК HSV-1 с геном *tk* в разных ориентациях (рис. 14.41). Сконструированные плазмиды pMLVTK и pMLVKT нарабатывали в клетках *E. coli* и трансформировали ими клетки L TK⁻. Обе плазмиды с примерно одинаковой эффективностью обеспечивали трансформацию клеток животных к фенотипу TK⁺. Гибридный провирус в результате встройки потерял ряд функций, необходимых для образования вирусных частиц. Поэтому для получения гибридного вирусного потомства использовали вирус-помощник. При этом были проанализированы три альтернативных подхода к получению линий клеток, продуцирующих гибридные ретровирусы (рис. 14.42). Во всех случаях вирусы, полученные из клеток, трансформированных к фенотипу TK⁺ и продуцирующих MLV, были способны трансдуцировать признак TK⁺ в клетки с фенотипом TK⁻. Ориентация гена тимидинкиназы внутри ДНК гибридных ретровирусов не оказывала заметного влияния на их свойства.

Для упрощения экспериментальной работы с дефектными гибридными ДНК вируса лейкемии мышей Д. Балтимор с соавторами (1983 г.) сконструировали линии клеток, комплементирующих *транс*-функции данного вируса. При этом был реализован более простой подход по сравнению с использованным при создании линий В3 и С3 для вируса некроза селезенки. В молекуле ДНК клонированного в плазмиде провируса Mo-MLV делетировали фрагмент

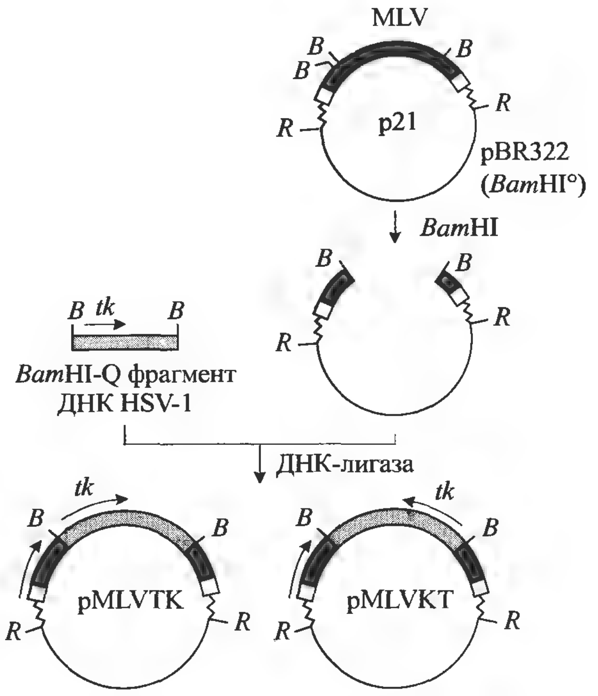


Рис. 14.41. Конструирование гибридных плазмид, содержащих ген *tk* HSV-1, встроенный в ДНК MLV. *R* — сайт узнавания *Eco*RI, *B* — *Bam*HI

длиной около 350 пн, содержащий участок E, необходимый для упаковки вирусной РНК в капсид. Такая ДНК неинфекционна, но в трансформированных клетках направляет синтез белковых продуктов генов *gag*, *pol* и *env*. Одна из охарактеризованных сублиний, содержащая в геноме дефектный по упаковке РНК провирус, была названа Ψ2 и обладала способностью комплементировать все *транс*-функции MLV. Это было доказано в эксперименте, в котором клетки трансформировали гибридной плазмидой pMLV*gpt*, несущей дефектную провирусную ДНК Mo-MLV со встроенным в нее геном *gpt*. Через сутки образовавшимся вирусом, находящимся в культуральной среде, инфицировали линию фибробластов мыши 3T3 и на селективной среде выявили стабильные клоны, синтезирующие фермент ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазу *E. coli*.

Таким образом, в клетках комплементирующих линий можно после трансфекции размножать дефектные ретровирусы, а затем инфицировать полученным препаратом любые чувствительные к данному вирусу линии клеток. При этом гибридная ДНК дефектного ретровируса будет эффективно интегрироваться в геном инфицированных клеток без образования вирусного потомства. Упаковывающие линии используют в большинстве современных работ по

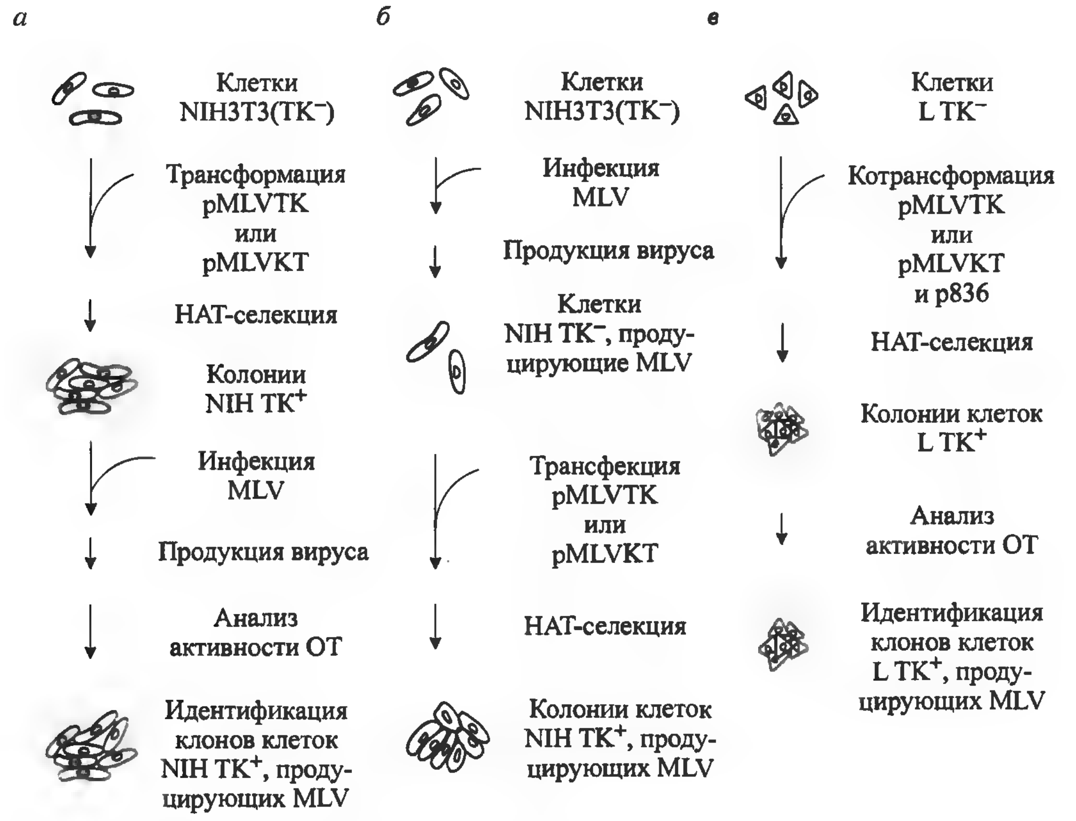


Рис. 14.42. Стратегии получения линий клеток (*а–в*), продуцирующих вирус лейкемии мышей, у которого часть капсидов содержит гибридные последовательности MLVTK или MLVKT. p836 — плазмида, содержащая полную копию провирусной ДНК MLV; ОТ — обратная транскриптаза

созданию методами генетической инженерии гибридных ретровирусов.

Способы конструирования ретровирусных векторов, предназначенных для трансдукции чужеродных генов, можно разделить на три основных типа.

1. В провирусной ДНК, клонированной в составе бактериальной плазмиды, удаляют все гены структурных белков и ревертазы (*транс*-функции) и на их место вводят сайты рестрикции. При этом сохраняют *цис*-действующие генетические элементы ретровирусов. Примером такого вектора является плазмида pMX1112 (рис. 14.43). Вводимая в вектор такого типа кодирующая последовательность экспрессируется в результате использования сигналов инициации и терминации транскрипции ретровируса.

2. Кроме целевого гена в геном гибридного ретровируса встраивают селективный маркер преимущественно доминантного типа. Это намного упрощает отбор клонов клеток, содержащих интегрированную ДНК гибридных ретровирусов. Наиболее часто таким маркером служит ген *neo*, так как селекция в данном случае (устойчивость к антибиотику G-418) проста и не требует специальной питательной среды. Для экспрессии двух независимых генов в составе провируса имитируется природный механизм раздельной экспрессии генов *gag – pol* и *env*, а именно, используются участки сплайсинга S_D и S_A для образования дополнительного субгеномного РНК-транскрипта. Один ген-эквивалент встраивается вместо генов *gag – pol*, а второй — вместо структурной части гена *env*. При этом участки S_D и S_A должны сохраняться. Примером таких ретровирусных векторов являются плазмиды pMX1122 и pZipNeo (см. рис. 14.43), реализован и более сложный вариант (см. рис. 14.45). Е. Джилбоа с соавторами использовали другой вектор данного типа rGE для встройки и попарной экспрессии различных генов (рис. 14.44). Показано, что ген, по которому осуществляется селекция трансформированных клонов клеток, может находиться как в положении A, так и в положении B в геноме гибридного дефектного ретровируса.

3. В гибридный ретровирус встраиваются два чужеродных гена: целевой неселектируемый ген и доминантный селективный маркер. При этом один ген транскрибируется с промотора векторного ретровируса, а второй — с лю-

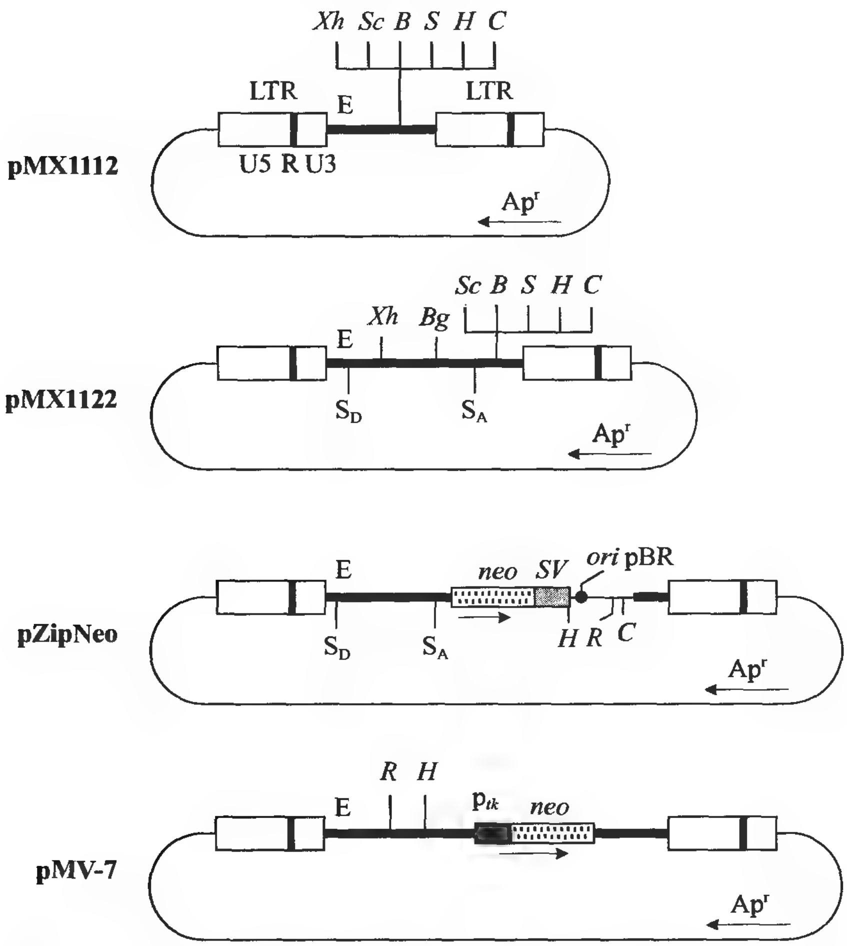
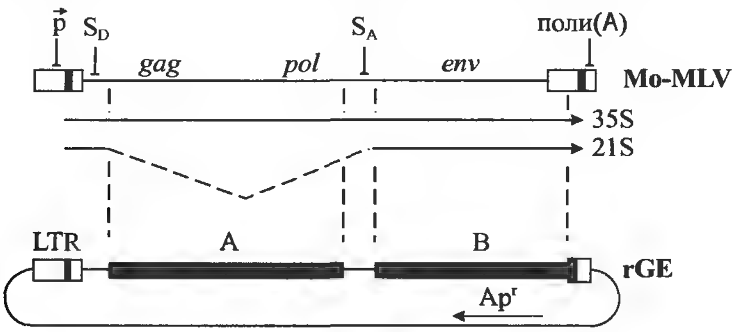


Рис. 14.43. Молекулярные векторы ретровирусов на основе провирусной ДНК вируса лейкемии мышей.

p_{tk} — промотор гена тимидинкиназы вируса простого герпеса; *neo* — бактериальный ген устойчивости к неомицину; *SV* — область раннего промотора вируса SV40; *Xh* — сайт гидролиза рестриктазой *Xho*I, *Sc* — *Sac*II, *B* — *Bam*HI, *Bg* — *Bgl*II, *S* — *Sal*I, *H* — *Hin*dIII, *C* — *Cla*I, *R* — *Eco*RI; S_D, S_A — донорный и акцепторный участки сплайсинга. Внутренние последовательности провирусной ДНК обозначены толстой линией, плазмида pRB322 — тонкой линией

бого встроенного промотора, способного инициировать транскрипцию в ядре клеток животных. Примером вектора данного типа является плазмида pZipNeo, описанная К. Цепко с соавторами в 1984 г. (см. рис. 14.43). Следует отметить, что транскрипция второго от 5′-конца провируса гена может иметь и противоположную ориентацию.

При работе с гибридными ретровирусами важным моментом является исследование их структуры после цикла репликации и интеграции в хромосомную ДНК клетки, так как эти процессы могут приводить к изменениям в целевой последовательности созданного ретровирусного генома. Наиболее просто данная задача решается при использовании челночных векторов. В своем составе они содержат области начала репликации таких полиомавирусов, как SV40 или вирус полиомы, а также *ori* плазмиды pBR322 (pZipNeo, см. рис. 14.43). В клетках млекопитающих ген *neo* транспозона Tn*5* в составе pZipNeo транскрибируется с провирусного промотора, находящегося в 5′ LTR, и обеспечивает устойчивость к антибиотику G-418. В клетках *E. coli* данный ген экспрессируется с собственного промотора и обусловливает устойчивость бактериальных клеток к неомицину (канамицину). Клетки, содержащие гибридный провирус из состава pZipNeo, можно слить с COS-клетками, продуцирующими Т-антиген SV40 (см. 14.1.2). В результате с *ori* SV40 инициируется многократная репликация ДНК, и происходит высвобождение за счет рекомбинации по вирусным LTR множественных копий внехромосомных кольцевых молекул ДНК, несущих провирусные последовательности. Эти последовательности включают область начала репликации pBR322 и поэтому могут реплицироваться в клетках *E. coli*. После трансформации клеток *E. coli* препаратом такой ДНК селектируют канамицин-устойчивые клоны, в которых экспрессируется ген *neo*. Затем из бактери-



		Гибриды:
dhfr	*tk*	**rGE-1**
neo	*tk*	**rGE-2**
tk	*dhfr*	**rGE-3**
neo	*dhfr*	**rGE-4**
tk	*neo*	**rGE-5**
dhfr	*neo*	**rGE-6**

Рис. 14.44. Структура ретровирусного вектора и полученные на его основе гибриды.

A, B — участки встройки целевых кодирующих последовательностей; p — промотор провируса; S_D, S_A — донорный и акцепторный участки сплайсинга. Стрелками обозначены транскрипты провирусной ДНК

альных клеток можно достаточно просто выделить гибридные плазмиды, изучить их структуру и при необходимости повторно ввести в культивируемые клетки животных.

Ретровирусные молекулярные векторы можно использовать для решения широкого круга задач. Прежде всего, это векторы, обеспечивающие высокоэффективную трансдукцию чужеродных генов в различные типы культивируемых клеток животных и их экспрессию. Получаемые линии клеток, как правило, стабильно сохраняют в составе своего генома гибридную ДНК дефектного ретровируса как дополнительный генетический элемент.

В 1982 г. в лаборатории Х. Темина было показано, что в гибридном провирусе вируса некроза селезенки, содержащем хромосомный ген α-глобина мыши с экзон-интронной организацией, в процессе пассирования культуры клеток происходит выщепление интронов из встроенной последовательности гена. В дальнейшем эти наблюдения были подтверждены для других хромосомных генов и других ретровирусных векторов.

Таким образом, с помощью ретровирусов можно получать непрерывные кодирующие последовательности раздробленных эукариотических генов, которые затем могут быть клонированы и экспрессированы в бактериях или дрожжах. В данных экспериментах наиболее целесообразно использовать челночные ретровирусные векторы, так как они обеспечивают оптимальный способ анализа структуры генома получаемых гибридов.

14.6.3. *Генетическая нестабильность гибридных ретровирусов*

Кроме явных преимуществ ретровирусы как молекулярные векторы имеют и тот недостаток, что они относительно нестабильны генетически. По имеющимся оценкам, частота мутирования ретровирусов и их гибридных вариантов достигает 0,5 % в расчете на цикл репликации. Это связано, по-видимому, с низкой корректирующей активностью (или ее полным отсутствием) у ферментов ревертазы и РНК-полимеразы, реплицирующих вирусный геном.

У гибридных вирусов, в которых используется природный механизм сплайсинга вирусной РНК (см. 14.6.2), могут наблюдаться делеции в геноме, обусловленные аномальным сплайсингом. Такое возможно, например, при случайном введении в гибридный геном последовательностей, узнаваемых как сайты сплайсинга (так называемые криптические сайты сплайсинга).

Гены, встраиваемые в ретровирусный вектор с собственным промотором, могут содержать сигналы терминации транскрипции, что при совпадении направления транскрипции целевого гена и провируса приведет из-за преждевременной терминации к нарушению синтеза полноразмерной геномной РНК. Такие сигналы нужно удалять на стадии конструирования гибридной ДНК либо ориентировать чужеродный

ген противоположно направлению транскрипции провируса. В последнем случае иногда могут возникать проблемы за счет столкновения противоположных «волн» транскрипции гибридного провируса. Поэтому, как правило, каждый конкретный случай создания гибридного провируса такого типа требует экспериментальной проверки его жизнеспособности (стабильности).

Учитывая неполноту наших знаний о факторах, влияющих на селекцию в клетке гибридных ретровирусов, важным элементом генно-инженерных работ следует считать анализ структуры генома (вплоть до секвенирования) отобранных после трансфекции вирусных клонов. Очень удобны для этих целей челночные векторы.

Можно ожидать, что вирусные препараты, полученные из культур — потомков индивидуальных инфицированных клеток, будут обладать бо́льшим генетическим единообразием, чем выделенные из трансфицированных клеток. Это связано с тем, что трансфицированные клетки часто несут множественные интегрированные копии экзогенной ДНК, причем некоторые из них могут подвергаться различного рода перестройкам и мутировать, и все они вносят вклад в состав вирусного препарата. Клетки же из инфицированных колоний содержат только индивидуальные копии провирусной ДНК.

14.6.4. Ретровирусы в качестве инструмента генной терапии

Разработка системы генетической трансформации культивируемых клеток позволила выдвинуть на повестку дня вопрос о возможности введения чужеродных генов в организм животных. Особое значение данные исследования имеют для ***генотерапии*** (или генной терапии) — методологии, направленной на устранение наследственных (генетических) дефектов организма. Наиболее целесообразно для этого использовать клетки тканей, которые в организме постоянно обновляются. Выделив такие клетки из организма животного, их можно подвергнуть генетической трансформации по определенному гену, отобрать и охарактеризовать клоны трансформантов, а затем ввести их снова животному-донору. Если введенные клетки будут размножаться *in vivo*, то они смогут обеспечивать организм белковым продуктом, кодируемым целевым чужеродным геном.

Наибольшие успехи в разработке методов генотерапии достигнуты при использовании стволовых клеток — клеток-предшественников, дающих начало в организме популяциям дифференцированных клеток. За счет стволовых клеток постоянно обновляются клетки однослойного эпителия тонкого кишечника, эпидермис (многослойный эпителий кожи), а также клетки крови. Те стволовые клетки, которые порождают только один вид дифференцированных клеток (эпителий тонкого кишечника или кожи), называют униипотентными, а те, которые дают начало нескольким их видам, — плюрипотентными (кроветворные клетки). Важное свойство стволовых клеток заключается в том, что они не являются терминально дифференцированными и способны к неограниченному делению. Часть дочерних клеток в зависимости от окружающих условий в организме встает на путь, необратимо ведущий к полной дифференцировке.

Основное внимание ученых привлечено к кроветворным стволовым клеткам. Кровь содержит много типов клеток, выполняющих совершенно различные функции — от транспорта кислорода до выработки антител. Но все они происходят от одного и того же типа плюрипотентных стволовых клеток, которые в основном находятся в костном мозге. Важным дополнительным местом гемопоэза (кроветворения) является селезенка.

Если животное подвергнуть рентгеновскому облучению в большой дозе, то за счет необратимых повреждений хромосомной ДНК клеточное деление прекращается во многих тканях, в том числе и в кроветворных. Через некоторое время животное погибает, прежде всего из-за неспособности организма восполнять утрату клеток крови. Облученное животное можно, однако, спасти, введя ему клетки костного мозга здорового иммунологически совместимого донора или, что еще надежней, собственные клетки, взятые из костного мозга до облучения. Инъецированные стволовые клетки в селезенке облученного реципиента через некоторое время (у мышей через 1–2 нед.) формируют множество обособленных узелков, содержащих пролиферирующую кроветворную ткань. Каждый такой узелок является клоновым вариантом, происшедшим от индивидуальной стволовой клетки.

Возможность манипулирования со стволовыми кроветворными клетками была с успехом использована при постановке методов генотерапии на модели мышей. Впервые принципиальную возможность генотерапии показали М. Кляйн с соавторами (1980 г.), трансформировав клетки костного мозга препаратом хромо-

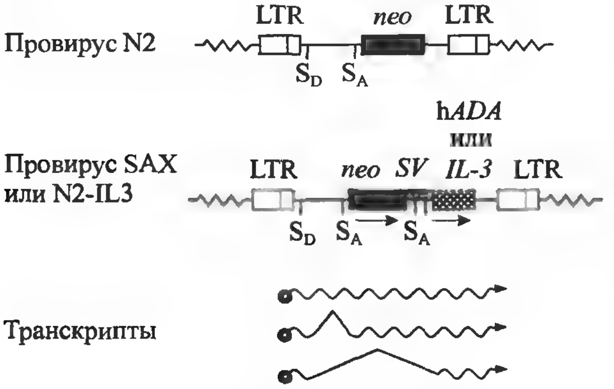


Рис. 14.45. Гибридные провирусы на основе вируса лейкемии мышей Молони.

IL-3 — кодирующая последовательность мышиного интерлейкина 3, h*ADA* — аденозиндезаминазы человека, встроенные после сегмента ранней области генома вируса SV40, содержащего два потенциально акцепторных участка сплайсинга. Волнистыми линиями обозначены первичный транскрипт и продукты его альтернативного сплайсинга

сомной ДНК устойчивой к метотрексату (Mtx^r) культуры мышиных клеток. Затем трансформированные клетки инъецировали животным, предварительно облученным высокими дозами радиации для подавления размножения собственных кроветворных клеток. После инъекции трансформированных клеток костного мозга мышам вводили такие количества метотрексата, которые не были летальными для животных, но значительно подавляли гемопоэз. В условиях такого селективного давления в организме мышей-реципиентов в основном происходило размножение экзогенных Mtx^r-клеток, и через 30–40 дней их содержание в кроветворных органах достигало 70–90 %. Инъецировав клетки костного мозга этих мышей другим облученным реципиентам, наблюдали такой же эффект. Активность дигидрофолатредуктазы, обеспечивающей устойчивость к метотрексату (см. 13.3.3), в экстрактах селезенки животных, содержащих трансформированные клетки, была в 2–4 раза выше, чем у контрольных мышей.

Несмотря на принципиально важные результаты, данный методический подход имеет ряд существенных недостатков. Во-первых, эффективность генетической трансформации клеток млекопитающих относительно невелика. Особенно ярко это может проявляться при трансформации клеток костного мозга, так как кроветворные стволовые клетки, представляющие непосредственный интерес для экспериментов по генотерапии, составляют менее 0,1 % всей популяции клеток костного мозга. Во-вторых, использование селективного маркера наряду с целевым геном в реальной генотерапии нежелательно, так как дополнительные генетические элементы могут обусловливать более сложный эффект на организм реципиента, чем ожидается.

Отмеченные недостатки можно преодолеть, применяя в качестве трансдуцирующих векторов ретровирусы. В силу высокой эффективности инфицирования широкого спектра клеток ретровирусы обеспечивают наиболее подходящий метод интеграции чужеродных генов в хромосомы клеток. Инкубируя клетки костного мозга совместно с монослоем клеток упаковывающей линии, продуцирующей гибридный ретровирус, можно быть уверенным, что и без дополнительной селекции большинство клеток костного мозга, в том числе и стволовые клетки, будут инфицированы дефектным по репликации гибридным ретровирусом и ДНК-копия его генома будет интегрирована в хромосомную ДНК клетки.

Одну из первых работ такого рода выполнили Г. Келлер с соавторами (1985 г.). Гибридным ретровирусом N2 (рис. 14.45) инфицировали клетки костного мозга мыши, а затем вводили их облученным животным. Через разные промежутки времени из органов реконструированных мышей выделяли ДНК и анализировали ее на наличие гибридного провируса N2. Оказалось, что провирус выявляется в лимфоузлах, тимусе, селезенке и костном мозге экспериментальных животных в течение многих недель наблюдения. Более того, были проведены эксперименты, в которых костный мозг первичных реципиентов использовали для реконструирования вторичных реципиентов. В одном случае был показан перенос стволовых клеток, содержащих провирус N2, от животного к животному в четырех пассажах.

Идя от простого к сложному, исследователи прежде всего обратили внимание на разработку методов генотерапии ряда хорошо изученных моногенных заболеваний системы гемопоэза, таких как серповидно-клеточная анемия, β-талассемия, синдром комбинированного иммунного дефицита (СКИД). Для лечения первых двух заболеваний в организм необходимо ввести правильно функционирующий ген β-глобина, а последнего — ген аденозиндезаминазы.

Многочисленные работы, выполненные в разных лабораториях, показали, что экспрессии гена β-глобина человека, клонированного в составе ретровирусного вектора, гораздо проще добиться в культуре клеток или клетках костного мозга, чем в организме реконструиро-

ванных животных. Это вызвано прежде всего тем, что экспрессия гена β-глобина подвергается *in vivo* сложной тканеспецифичной и временной регуляции и изучена еще не полностью. Лишь в редких случаях удается получать положительные результаты на подопытных животных. Возможно, это связано с положением целевого гена в геноме клетки, так как место интеграции провируса может быть самым разным и не поддается экспериментальному регулированию. Так, в первой удачной работе Е. Джерзак с соавторами (1988 г.) после трансдукции целевого гена ретровирусом в клетки костного мозга мышей добились долговременной экспрессии гена β-глобина человека лишь у 8 из 104 животных. Сложность состоит также в том, что продукция нормального β-глобина должна быть таковой, чтобы не нарушался баланс цепей глобина, в противном случае β-талассемия может перейти в другую патологию — α-талассемию.

Как видим, успешно решать задачи генотерапии можно лишь тогда, когда будет подробно изучена регуляция функционирования *in vivo* целевого гена, который предполагается ввести в организм реципиента. Кроме того, в идеале требуется метод, позволяющий удалять поврежденный ген и встраивать на его место полноценный. Но пока эта проблема не решена.

Дифференциация кроветворных стволовых клеток по различным путям тонко регулируется большим набором ростовых факторов — цитокинов, продуцируемых клетками стромы костного мозга (моноцитами, лимфоцитами, фибробластами, эндотелиальными клетками). Дисбаланс цитокинов может приводить к патологиям. Например, П. Вонг с соавторами (1989 г.) сконструировали гибридный ретровирус N2-IL3 (см. рис. 14.45) и с его помощью трансдуцировали в клетки костного мозга мыши структурный ген мышиного интерлейкина 3 (IL-3). Провирус N2-IL3 в процессе транскрипции с промотора 5′ LTR и альтернативного сплайсинга способен производить мРНК, кодирующую IL-3. У 20–25 % облученных животных, реконструированных такими клетками костного мозга, выявлен миелопролиферативный синдром, характеризующийся 10–100-кратным увеличением в крови количества лейкоцитов и гипертрофией селезенки и печени, обусловленной инфильтрацией и пролиферацией миелоидных клеток. Как видим, разработанная методология прижизненной трансдукции генов в организм животных дает уникальную возможность изучать экспрессию целевых ге-

Рис. 14.46. Схема эксперимента по переносу чужеродных генов в организм макака резуса

нов *in vivo* и влияние продуктов этой экспрессии на жизнедеятельность.

Эксперименты по трансдукции генов с помощью ретровирусных векторов проводятся не только на мышах. Так, С. Андерсон с соавторами в 1986 г. продемонстрировали возможность переноса гена аденозиндезаминазы человека в организм макака резуса с помощью гибридного ретровируса SAX (см. рис. 14.45; рис. 14.46). Традиционной предклинической моделью трансплантации костного мозга у человека является собака. Поэтому на данной модели также проводятся эксперименты по прижизненной трансдукции генов и получены первые положительные результаты.

М. Калеко с соавторами (1991 г.) предложили метод трансдукции генов в клетки печени животного. Гибридный ретровирус, содержащий ген *neo*, инъецировали в митотически активную (регенерирующую) паренхиму печени мыши и показали, что при этом происходил эффективный перенос чужеродного гена и длительная его экспрессия *in vivo*.

В качестве клеток-мишеней для генотерапии также рассматриваются фибробласты кожи, эндотелиальные клетки кровеносных сосудов и др.

Хотя ретровирусы являются в настоящее время наиболее подходящими трансдуцирующими векторами для целей генотерапии, им присущи и некоторые недостатки. Во-первых, они интегрируют ДНК-копию своего генома в самые разные места хромосом клеток-мишеней, что может приводить к инактивации или нарушению регуляции различных генов. Преодолеть данное затруднение пока не удается.

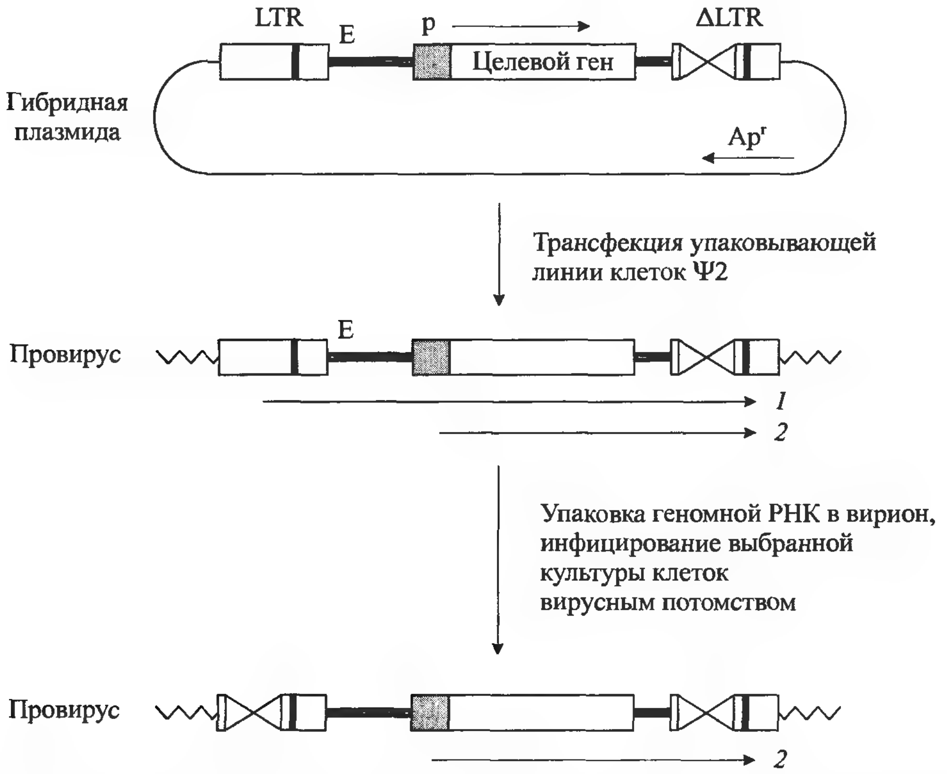


Рис. 14.47. Схема функционирования самоинактивирующегося ретровирусного молекулярного вектора на основе провирусной ДНК вируса лейкемии мышей Молони:

1 — транскрипт, синтезируемый с ретровирусного промотора, *2* — со встроенного промотора. р — экзогенный промотор, направляющий транскрипцию целевого гена; Е — сайт упаковки вирусной РНК

Во-вторых, промотор, находящийся в 3′ LTR провируса, может направлять транскрипцию соседних генов хозяина. Более того, мощные усилители транскрипции провируса также могут активировать транскрипцию разных (даже удаленных) генов хозяина, включая онкогены. Избежать подобного эффекта удалось, разработав ***самоинактивирующиеся ретровирусные векторы***. Промотор и активатор транскрипции ретровируса расположены в области U3 обоих вирусных LTR (см. рис. 14.38). Для вируса жизненно важной является область U3 в 5′ LTR провируса, так как с этого промотора транскрибируется геномная РНК, вирусная РНК содержит единственный участок u3 в 3′-концевой части молекулы и при обратной транскрипции область u3 копируется в 5′ LTR провируса. В самоинактивирующихся ретровирусных векторах с помощью рестриктаз делетируют основную часть области u3 в 3′ LTR для удаления промотора и усилителя транскрипции. В такой вектор можно поместить целевой ген с любым подстроенным к нему промотором (рис. 14.47). После трансфекции упаковывающих клеток гибридная ДНК интегрируется в хромосомную ДНК, и с провируса транскрибируется как вирусная геномная РНК (с делецией в области u3 на 3′-конце), так и мРНК целевого гена. Вирусная РНК упаковывается в вирионы. Полученным вирусным потомством можно инфицировать необходимые в эксперименте клетки (например клетки костного мозга). Попадая в клетку, РНК гибридного ретровируса подвергается обратной транскрипции, в результате которой делеционный вариант u3 переносится в 5′ LTR, т. е. такой провирус содержит делеции промоторных районов уже в обоих LTR. В этом случае с провируса будет транскрибироваться лишь встроенный ген с собственного промотора, а геномная вирусная РНК транскрибироваться не способна.

В целом следует отметить, что, несмотря на достигнутые несомненные успехи в разработке методов генотерапии, впереди экспериментаторов ждет множество проблем, связанных с реализацией модельных схем для генотерапии человека. Учитывая, что в настоящее время мировой наукой прилагаются огромные усилия к изучению генома человека и расшифровке молекулярных механизмов многочисленных наследственных заболеваний, можно надеяться, что в недалеком будущем многие проблемы удастся решить.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Браун Э. М. К., Скотт М. Р. Д. Ретровирусные векторы // Новое в клонировании ДНК. Методы / Под ред. Д. Гловера. М.: Мир, 1989. С. 272–307.

Колосова И. В., Серегин С. В., Кочнева Г. В. и др. Изучение ортопоксвирусных генов, кодирующих kelch-подобные белки. II. Создание вариантов вируса оспы коров с направленно делетированными генами // Молекуляр. биология. 2003. Т. 37. С. 585–594.

Томилин Н. В., Кавсан В. М. Перенос генов в клетки млекопитающих с помощью ретровирусных векторов // Биополимеры и клетка. 1989. № 5. С. 26–36.

Тотменин А. В., Гашников П. В., Щелкунов С. Н., Сандахчиев Л. С. Использование гена, ответственного за образование геморрагий, в качестве фенотипического маркера при создании гибридных вариантов вируса вакцины // Докл. АН СССР. 1989. Т. 305. С. 1246–1248.

Щелкунов С. Н. Клонирование генов. Новосибирск: Наука, 1986. 228 с.

Щелкунов С. Н. Иммуномодуляторные белки ортопоксвирусов // Молекуляр. биология. 2003. Т. 37. С. 41–53.

Щелкунов С. Н., Нестеров А. Е., Рязанкин И. А. и др. Создание кандидатной живой поливалентной вакцины против вирусов иммунодефицита человека, гепатита В и ортопоксвирусов // Докл. РАН. 2003. Т. 390. С. 834–838.

Щелкунов С. Н., Тотменин А. В., Сафронов П. Ф. и др. Множественные генетические различия между вирусами натуральной оспы и оспы обезьян // Докл. РАН. 2002. Т. 384. С. 126–130.

Alkhatib G., Briedis D. J. High-level eucaryotic *in vivo* expression of biologically active measles virus hemagglutinin by using an adenovirus type 5 helper-free vector system // J. Virol. 1988. Vol. 62. P. 2718–2727.

Alonso-Caplen F. V., Katze M. G., Krug R. M. Efficient transcription, not translation, is dependent on adenovirus tripartite leader sequences at late times of infection // Ibid. P. 1606–1616.

Ashman C. R. Retroviral shuttle vectors as a tool for the study of mutational specificity (base substitution/deletion/mutational hotspot) // Mutation Res. 1989. Vol. 220. P. 143–149.

Atchison M. L. Enhancers: mechanisms of action and cell specificity // Ann. Rev. Cell. Biol. 1988. Vol. 4. P. 127–153.

Baer G. M., Brooks R. C., Foggin C. M. Oral vaccination of dogs fed canine adenovirus in baits // Am. J. Vet. Rec. 1989. Vol. 50. P. 836–837.

Bhat R. A., Furtado, Thimmappaya B. Efficient expression of small RNA polymerase III genes from a novel simian virus 40 vector and their effect on viral gene expression // Nucl. Acids Res. 1989. Vol. 17. P. 1159–1176.

Boyle D. B., Coupar B. E. H. Construction of recombinant fowlpox viruses as vectors for poultry vaccines // Virus Res. 1988. Vol. 10. P. 343–356.

Camonis J. H., Cassan M., Rousset J. P. Of mice and yeast: versatile vectors which permit gene expression in both budding yeast and higher eucaryotic cells // Gene. 1990. Vol. 86. P. 263–268.

Carswell S., Alwine J. C. Efficiency of utilization of the simian virus 40 late polyadenylation site: effects of upstream sequences // Mol. Cell. Biol. 1989. Vol. 9. P. 4248–4258.

Cepko C., Roberts B. E., Mulligan R. C. Construction and application of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector // Cell. 1984. Vol. 37. P. 1053–1062.

Cline M. J., Stang H., Mercola K. et al. Gene transfer in intact animals // Nature. 1980. Vol. 284. P. 422–425.

Cole G. E., Stacy-Phipps S., Nunberg J. H. Recombinant feline herpesviruses expressing feline leukemia virus envelope and gag proteins // J. Virol. 1990. Vol. 64. P. 4930–4936.

Conway B. M., Morgan A., Mackett M. Expression of Epstein–Barr virus membrane antigen gp340/220 in mouse fibroblasts using a bovine papillomavirus vectors // J. Gen. Virol. 1989. Vol. 70. P. 739–744.

Cornetta K., Morgan R. A., Anderson W. F. Safety issues related to retroviral-mediated gene transfer in humans // Hum. Gene Ther. 1991. Vol. 2. P. 5–14.

Deshmane S. L., Fraser N. W. During latency, herpes simplex virus type 1 DNA associated with nucleosomes in a chromatin structure // J. Virol. 1989. Vol. 63. P. 943–947.

Desrosiers R. C., Kamine J., Bakker A. et al. Synthesis of bovine growth hormone in primates by using a herpesvirus vector // Mol. Cell. Biol. 1985. Vol. 5. P. 2796–2803.

Dzierzak E. A., Papayannopoulou T., Mulligan R. C. Lineage-specific expression of human β-globin gene in murine bone marrow transplant recipients reconstituted with retrovirus-transduced stem cells // Nature. 1988. Vol. 331. P. 35–41.

Esposito J. J., Knight J. C., Shaddock J. H. et al. Successful oral rabies vaccination of raccoons with raccoon poxvirus recombinants expressing rabies virus glycoprotein // Virology. 1988. Vol. 165. P. 313–316.

Graham F. L., Rudy J., Brinkley P. Infectious circular DNA of human adenovirus type 5: regeneration of viral DNA termini from molecules lacking terminal sequences // EMBO J. 1989. Vol. 8. P. 2077–2085.

Hawley R. C., Covarrubias L., Hawley T., Mintz B. Handicapped retroviral vectors efficiently transduce foreign genes into hematopoietic stem cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. Vol. 84. P. 2406–2410.

Jalanco A., Kallio A., Ruohonen-Lehto M. et al. An EBV-based mammalian cell expression vector for

efficient expression of cloned coding sequences // Biochim. Biophys. Acta. 1988. Vol. 949. P. 206–212.

Johnson D. C., Ghosh-Choudhury G., Smiley J. R. et al. Abundant expression of herpes simplex virus glycoprotein gB using an adenovirus vector / Virology. 1988. Vol. 164. P. 1–14.

Johnson G. P., Goebel S. J., Paoletti E. An update on the vaccinia virus genome // Virology. 1993. Vol. 196. P. 381–401.

Kaleko M., Garcia J., Miller A. D. Persistent gene expression after retroviral gene transfer into liver cells *in vivo* // Hum. Gene Ther. 1991. Vol. 2. P. 27–32.

Keller G., Paige C., Gilboa E., Wagner E. F. Expression of a foreign gene in myeloid and lymphoid cells derived from multipotent hematopoietic precursors // Nature. 1985. Vol. 318. P. 149–151.

Kitts P. A., Ayres M. D., Possee R. D. Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors // Nucl. Acids Res. 1990. Vol. 18. P. 5667–5672.

Lim B., Williams D. A., Orkin S. H. Retrovirus-mediated gene transfer of human adenosine deaminase: expression of functional enzyme in murine hematopoietic stem cells *in vivo* // Mol. Cell. Biol. 1987. Vol. 7. P. 3459–3465.

Livington D. M., Bradley M. K. The simian virus 40 large T antigen. A lot packed into a little // Mol. Biol. Med. 1987. Vol. 4. P. 63–80.

Marriott S. J., Brady J. Enhancer function in viral and cellular gene regulation // Biochim. Biophys. Acta. 1989. Vol. 989. P. 97–110.

Massie B., Gluzman Y., Hassell J. A. Construction of a helper-free recombinant adenovirus that expresses polyomavirus large T antigen // Mol. Cell. Biol. 1986. Vol. 6. P. 2872–2883.

McGeoch D. J. The genomes of the human herpesviruses // Annu. Rev. Microbiol. 1989. Vol. 43. P. 235–265.

Merchlinsky M., Moss B. Introduction of foreign DNA into the vaccinia virus genome by *in vitro* ligation: recombination-independent selectable cloning vectors // Virology. 1992. Vol. 190. P. 522–526.

Moss B. Recombinant DNA virus vectors for vaccination // Semin. Immunol. 1990. Vol. 2. P. 317–327.

Moss B. Poxviruses as eukaryotic expression vectors // Semin. Virol. 1992. Vol. 3. P. 277–283.

Moss B., Smith G. L., Gerin J. L., Purcell R. H. Live recombinant vaccinia virus protects chimpanzees against hepatitis B // Nature. 1984. Vol. 311. P. 67–70.

Peterson D. O., Beifuss K. K., Morley K. L. Context-dependent gene expression: *cis*-acting genative effects of specific procaryotic plasmid sequences on eucaryotic genes // Mol. Cell. Biol. 1987. Vol. 7. P. 1563–1567.

Putnak J. R., Schlesinger J. J. Protection of mice against yellow fever virus encephalitis by immunization with a vaccinia virus recombinant encoding the yellow fever virus non-structural proteins, NS1, NS2a and NS2b // J. Gen. Virol. 1990. Vol. 71. P. 1697–1702.

Rodriguez J. F., Rodriguez D., Rodriguez J. R. et al. Expression of the firefly luciferase gene in vaccinia virus: a highly sensitive gene marker to follow virus dissemination in tissues of infected animals // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. Vol. 85. P. 1667–1671.

Ruohonen-Lehto M., Korpela K., Soderlund H., Ulmanen I. Integration and integrity of a bovine papillomavirus expression vector in different mammalian cells // J. Biotechnol. 1987. Vol. 6. P. 91–105.

Scheiflinger F., Dorner F., Falkner F. G. Construction of chimeric vaccinia viruses by molecular cloning and packaging // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1992. Vol. 89. P. 9977–9981.

Shih M. F., Arsenakis M., Tiollais P., Roizman B. Expression of hepatitis B virus S gene by herpes simplex virus type 1 vectors carrying α- and β-regulated gene chimeras // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. Vol. 81. P. 5867–5870.

Smith G. L. Vaccinia virus glycoproteins and immune evasion // J. Gen. Virol. 1993. Vol. 74. P. 1725–1740.

Smith G. L., Mackett M. The design, construction, and use of vaccinia virus recombinants // Recombinant Poxviruses / Eds. M. M. Binns, G. L. Smith. London: CRC Press, 1992. P. 81–122.

Stow N. D., Murray M. D., Stow E. C. *Cis* acting signals involved in the replication and packaging of herpes simplex virus type-1 DNA // Cancer Cells. 1986. Vol. 4. P. 497–507.

Taylor J., Weinberg R., Tartaglia J. et al. Nonreplicating viral vectors as potential vaccines: recombinant canarypox virus expressing measles virus fusion (F) and hemagglutinin (HA) glycoproteins // Virology. 1992. Vol. 187. P. 321–328.

Whealy M. E., Baumeister K., Robbins A. K., Enquist L. W. A herpesvirus vector for expression of glycosylated membrane antigens: fusion proteins of pseudorabies virus gIII and human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins // J. Virol. 1988. Vol. 62. P. 4185–4194.

Wong P. M. C., Chung S.-W., Dunbar C. E. et al. Retrovirus-mediated transfer and expression of the interleukin-3 gene in mouse hematopoietic cells result in a myeloproliferative disorder // Mol. Cell. Biol. 1989. Vol. 9. P. 798–808.

Yee J. K., Moores J. C., Jolly D. J. et al. Gene expression from transcriptionally disabled retroviral vectors // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. Vol. 84. P. 5197–5201.

Yu S. F., Ruden T., Kantoff P. W. et al. Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. Vol. 83. P. 3194–3198.

Глава 15
ВИРУСЫ НАСЕКОМЫХ КАК ВЕКТОРЫ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ ЧУЖЕРОДНЫХ ГЕНОВ

Baculoviridae является большим семейством, объединяющим вирусы, патогенные для насекомых, принадлежащих преимущественно к отрядам чешуекрылых, двукрылых и перепончатокрылых. Круг хозяев разных видов бакуловирусов ограничен близкородственными видами насекомых, причем заболевания среди них носят характер эпизоотии с массовой гибелью. Бакуловирусы безвредны для млекопитающих, птиц, рыб; они рекомендованы Всемирной организацией здравоохранения для применения в качестве избирательно действующих вирусных инсектицидов. В связи с этим бакуловирусы привлекли к себе внимание исследователей. Еще больший интерес к вирусам данного семейства стал проявляться в последние годы в связи с использованием их в качестве молекулярных векторов для введения и экспрессии чужеродных генов в организме насекомых и культурах клеток насекомых.

15.1. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БАКУЛОВИРУСОВ

Вирионы бакуловирусов представляют собой палочковидные нуклеокапсиды, заключенные в липопротеиновую оболочку. Длина их составляет 250–400 нм, диаметр — 50–100 нм. Вирусным геномом является крупная двухцепочечная кольцевая молекула ДНК размером от 88 до 160 тпн. Две субгруппы бакуловирусов упаковывают свои вирионы в большие белковые кристаллы — тела включения, образующиеся в инфицированных клетках. Это обеспечивает стабильное сохранение вируса в окружающей среде.

Субгруппа A состоит из вирусов ядерного полиэдроза (NPV), которые в процессе внутриклеточного развития образуют в ядре клетки кристаллические белковые тела включения — полиэдры, более или менее геометрически правильная форма и размеры которых являются специфичными для каждого вида вируса. Полиэдры состоят из белка полиэдрина, и размеры их колеблются от 1 до 15 мкм. При кристаллизации полиэдрина в ядрах клеток палочковидные вирусные частицы, формирующиеся здесь же, во множестве попадают внутрь полиэдров. Поверхность полиэдров покрывается полисахаридной мембраной.

Субгруппу B составляют вирусы гранулеза (GV). Инфекция данными вирусами завершается образованием в цитоплазме кристаллических тел включения в виде овальных гранул, состоящих из вирусспецифического белка гранулина. В каждой грануле, как правило, расположен один вирион. Размер гранул находится в интервале 0,3–1 мкм.

В субгруппу C входят бакуловирусы, не образующие тела включения.

Полиэдры и гранулы бакуловирусов нерастворимы в воде при кислой и нейтральной реакции среды. В природе личинки насекомых заражаются, поедая с кормом белковые кристаллы, содержащие вирусные частицы. Тела включения растворяются только в содержимом средней кишки насекомого, имеющем щелочную реакцию. Освобождаясь, вирионы инфицируют клетки эпителия кишечника, в которых первоначально формируются свободные вирионы, проникающие через плазматическую мембрану этих клеток. Попадая в гемолимфу, вирионы разносятся по организму и заражают другие ткани. По достижении конечной стадии инфекции продуцируются вируссодержащие тела включения.

Регуляторные механизмы, обеспечивающие синтез полиэдрина или гранулина, представляют значительный интерес, так как эти белки продуцируются в бо́льших количествах, чем какие-либо другие известные вирусные белки, синтезируемые при инфицировании эукариотических клеток. Полиэдрин к исходу инфекции

составляет более 25 % суммарного белка клетки. Такой интенсивный синтез белка обусловлен высокой скоростью синтеза мРНК полиэдрина и накоплением ее в клетках в большом количестве. Все это указывает на наличие в гене полиэдрина очень сильного промотора.

Проводятся активные исследования молекулярно-биологических закономерностей функционирования генома вирусов ядерного полиэдроза. Однако исследования ограничены в основном лишь теми немногочисленными вирусами, для которых получены пермиссивные культуры клеток насекомых. Наилучшие результаты достигнуты для NPV калифорнийской совки *Autographa californica* (AcNPV).

ДНК бакуловирусов реплицируется в ядре хозяйской клетки. Регуляция экспрессии генов у AcNPV, подобно большинству крупных ДНК-содержащих вирусов, осуществляется по каскадному типу. Предранние α-гены активируются факторами клетки-хозяина, и для их экспрессии не требуется предварительный синтез вирусных белков. Продукты α-генов активируют запаздывающие ранние β-гены и некоторые поздние γ-гены. Экспрессия поздних генов связана с синтезом вирусной ДНК. Бакуловирусы уникальны тем, что имеют четвертый временной класс генов — так называемые очень поздние δ-гены, которые обусловливают образование тел включения и упаковку в них вирионов. δ-Гены интенсивно экспрессируются в тот период, когда функционирование α-, β- и γ-генов уже репрессировано. К δ-генам относятся гены полиэдрина и белка с молекулярной массой 10 кДа (белок p10). Большинство изученных генов вирусов ядерного полиэдроза имеют непрерывную кодирующую последовательность.

При инфицировании пермиссивной культуры клеток бакуловирусы, как и в организме насекомого, образуют две инфекционные формы. Внеклеточный вирус продуцируется на начальном этапе инфекции (при заражении AcNPV линии клеток совки *Spodoptera frugiperda* — в первые 10–24 ч) и представляет собой единичные нуклеокапсиды, окруженные оболочкой, образуемой в процессе их выхода через клеточную мембрану. В период с 12 до 18 ч после инфицирования наблюдается значительное снижение уровня синтеза мРНК генов клетки-хозяина. Получаемая на данном этапе форма ответственна за распространение вируса от клетки к клетке. Она инфекционна как для личинок, так и для культуры клеток. Через 18 ч после заражения нуклеокапсиды начинают одеваться в оболочку внутри ядра клетки, и на поздней стадии инфекции синтезируется вторая инфекционная форма, в которой вирусные частицы включены в большую белковую капсулу — полиэдр. Эта форма инфекционна лишь для личинок.

Важно отметить, что полиэдрин, синтезирующийся в цитоплазме клетки, транспортируется в ядро, где он кристаллизуется. Возможно, таким образом полиэдрин удаляется из внутриклеточного пула, что уменьшает негативное влияние суперпродукции данного чужеродного белка на метаболизм клетки и обусловливает его продолжительный синтез.

Одновременно с полиэдрином в большом количестве синтезируется белок p10. Данный белок представляет собой структурный элемент скоплений волокон, выявляемых в ядре и цитоплазме клеток, инфицированных бакуловирусом, и играет важную роль в формировании электронно-плотных образований в ядре и в сборке поверхностной полисахаридной мембраны полиэдров.

В ряде лабораторий, используя метод транскрипционного и трансляционного картирования, на геноме AcNPV определили положение многочисленных генов, в том числе генов полиэдрина и белка p10. Оказалось, что ген полиэдрина находится в *Eco*RI-I-фрагменте вирусной ДНК, а ген белка p10 — в *Eco*RI-P-фрагменте. Данные фрагменты клонировали в составе векторных плазмид *E. coli* и расшифровали их нуклеотидную последовательность (1982–1986 гг.).

Транскрипция генов полиэдрина или гранулина и белка p10, по-видимому, направляется вирусспецифичной РНК-полимеразой. Для δ-генов в 5′-концевой некодирующей части за 20–70 нуклеотидов до триплета ATG выявлен консервативный район, имеющий усредненную последовательность 5′ TAAGTATT 3′. Внутри этой последовательности осуществляется инициация транскрипции генов бакуловирусов. Возможно, она также влияет на скорость инициации транскрипции мРНК, транспорт ее из ядра или защищает мРНК от деградации.

М. Козак (1986 г.), обработав большой массив информации, определила, что последовательности около инициаторного кодона AUG влияют на уровень трансляции эукариотической мРНК. При этом остаток аденина в положении –3 имеет доминантный эффект для достижения высокого уровня трансляции. Другие последовательности, окружающие AUG, также оказывают воздействие на уровень трансляции, однако оно обычно значительно только в тех случаях, когда нуклеотид (–3) не является пурином. Анализ, выполненный для 9 δ-генов раз-

личных бакуловирусов, показал в районе инициаторного кодона AUG следующую частоту встречаемости нуклеотидов:

$$\begin{array}{lll} -3 & +1 & \\ \bullet\; U_4A_4 \bullet & & C_4 \\ A_9A_3C_3AUG & & G_2 \\ & & U_2 \\ C_2U_2 & & A_1 \end{array}$$

Все эти гены содержат консервативный аденин в положении –3, что указывает на эффективную трансляцию матричных РНК δ-генов.

Терминация транскрипции, полиаденилирование мРНК бакуловирусов, по-видимому, осуществляются ферментами процессинга 3′-конца мРНК клетки-хозяина.

15.2. КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ЧУЖЕРОДНЫХ ГЕНОВ В СОСТАВЕ ГЕНОМА БАКУЛОВИРУСОВ

ДНК бакуловирусов инфекционна. Для ряда представителей данного семейства хорошо разработаны методы трансфекции личинок насекомых и пермиссивных культур клеток.

Поскольку ДНК этих вирусов имеет большие размеры и, как следствие, большое число мест гидролиза рестриктазами, классическая генно-инженерная реконструкция вирусной ДНК *in vitro* обычно неприменима. В данном случае необходимо использовать подход, первоначально опробованный на вирусе простого герпеса. Целевой ген встраивают внутрь фрагмента вирусной ДНК, клонированного в составе векторной плазмиды. В результате получают конструкцию, в которой целевой ген фланкирован последовательностями ДНК из определенного района вирусного генома. Котрансфекцией в чувствительные клетки вводят нативную вирусную ДНК и гибридную плазмиду. В процессе рекомбинации по участкам гомологии происходит встройка целевого гена в выбранный участок вирусного генома.

Поскольку образование полиэдров легко выявляется фенотипически, решено было использовать этот маркер для отбора гибридных вирусов, содержащих вставки в гене полиэдрина. В лаборатории М. Саммерса оценили возможность такой селекции в модельных экспериментах (1983 г.). Авторы воспользовались тем, что в *Eco*RI-I-фрагменте AcNPV единственное место гидролиза рестриктазой *Kpn*I находится в структурной части гена полиэдрина (рис. 15.1). Гибридную плазмиду, содержащую *Eco*RI-I-фрагмент вирусной ДНК, расщепляли *Kpn*I и образовавшуюся линейную молекулу ДНК гидролизовали с концов экзонуклеазой III и нуклеазой S1. Затем укороченные в результате такой обработки молекулы переводили в кольцевую форму с помощью ДНК-лигазы фага Т4. Для дальнейших исследований использовали плазмиды pd10 и pd16, содержащие фрагменты генома AcNPV, у которых в районе сайта *Kpn*I делетированы последовательности гена полиэдрина размером примерно 300 и 800 пн соответственно. В пермиссивные для вируса клетки котрансфекцией вводили плазмиду pd10 или pd16 и ДНК AcNPV дикого типа. При этом брали значительный избыток плазмиды по отношению к вирусной ДНК. Анализ негативных колоний вируса, образовавшихся в результате такой трансфекции, показал, что около 2 % вирусных клонов были не способны формировать полиэдры. В то же время среди 10 тыс. негативных колоний, полученных после трансфекции молекулами индивидуальной ДНК AcNPV, не было обнаружено ни одного клона вируса, дефектного по образованию полиэдров. Таким образом, сконструированные делеционные варианты вируса имели легко выявляемый измененный фенотип негативных колоний. Делеции не сказались на жизнеспособности вируса и эффективности экспрессии дефектного гена полиэдрина. Все это указывало на перспективность использования гена полиэдрина в качестве места встройки при создании гибридных вирусов.

Расшифровка последовательности нуклеотидов гена полиэдрина AcNPV (1983 г.) позволила локализовать промотор данного гена и с помощью нуклеазы Bal31, рестриктаз и синтетического *Bam*HI-линкера сконструировать плазмиды pAc373 и pAc380 для встройки чужеродных последовательностей под контроль этого промотора (см. рис. 15.1). Встроенный в плазмиды pAc по *Bam*HI-участку фрагмент ДНК оказывается фланкированным последовательностями ДНК AcNPV. Это позволяет при совместной трансфекции вирусной ДНК и гибридной плазмидой интегрировать в геном AcNPV чужеродную последовательность за счет рекомбинации плазмидной и вирусной ДНК по областям гомологии.

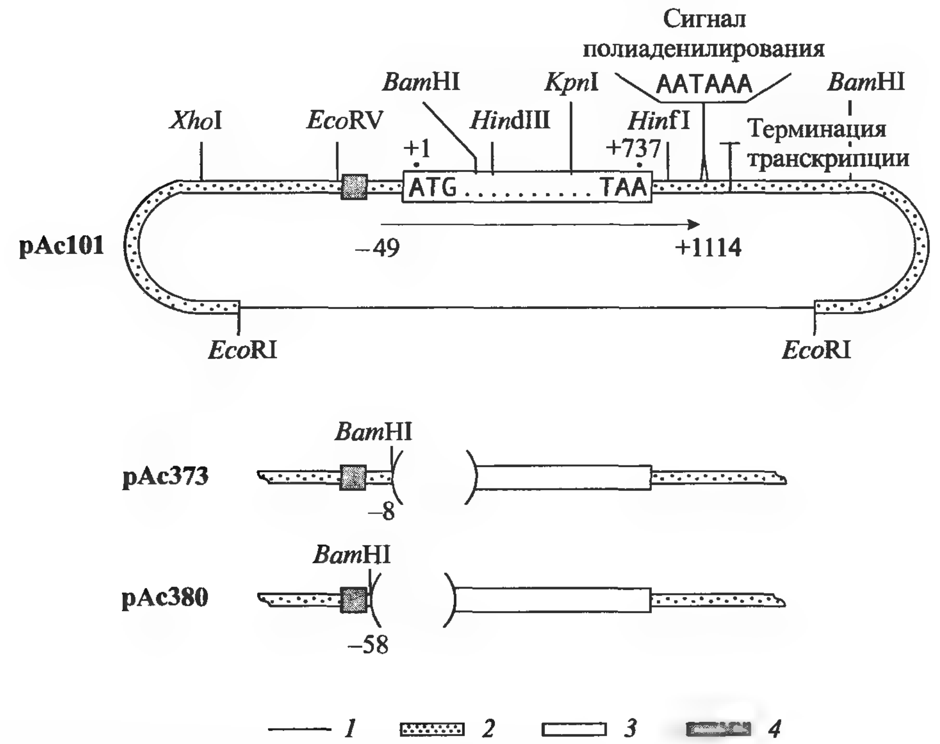


Рис. 15.1. Структура гибридных плазмид для встройки чужеродных последовательностей в геном вируса ядерного полиэдроза калифорнийской совки:

1 — векторная плазмида pUC8; *2* — *Eco*RI-фрагмент генома AcNPV; *3* — структурная часть гена полиэдрина; *4* — промотор.
Стрелкой обозначена мРНК полиэдрина

Возможность использовать вирус ядерного полиэдроза калифорнийской совки в качестве экспрессирующего вектора показана в 1983 г. В pAc380 встроили фрагмент геномной ДНК человека, содержащий полную кодирующую последовательность фибробластного интерферона (IFN-β) человека, три пары нуклеотидов, предшествующие ATG-триплету, и всю 3′-нетранслируемую последовательность гена IFN-β, включая сигнал полиаденилирования. Сконструированную плазмиду pAc380-IFN-β ввели в клетки совместно с ДНК AcNPV. По морфологии выявляли бляшки рекомбинантных вирусов с нарушенным геном полиэдрина. Выход рекомбинантов составил в среднем 0,5 %. Гибридный вирус Ac380-IFN-β в культуре клеток совки *Spodoptera frugiperda* реплицировался с такой же скоростью, как и вирус дикого типа. Это доказывает, что встройка фрагмента ДНК в ген полиэдрина не оказывает существенного влияния на жизнеспособность вируса. При анализе экспрессии клонированного гена в культуре клеток насекомых, инфицированных гибридным вирусом, выявили высокий уровень продукции β-интерферона человека (биологическая активность достигала $5 \cdot 10^9$ е. а./л). Белок IFN-β гликозилировался и эффективно секретировался в среду.

С помощью разработанной векторной системы вируса ядерного полиэдроза калифорнийской совки в лаборатории Л. Миллера в 1984 г. был создан вариант данного вируса, в геноме которого под контролем промотора гена полиэдрина находился структурный ген β-галактозидазы *E. coli*. При добавлении в среду галактозида Xgal бляшки гибридного вируса окрашивались в синий цвет. Данный фенотипический маркер затем с успехом использовали в других лабораториях и для других вирусов.

В 1985 г. М. Саммерс с сотрудниками осуществили встройку в геном AcNPV фрагмента кДНК, содержащего полную кодирующую последовательность гена интерлейкина 2 человека, ограниченную с 5′-конца 31 пн и с 3′-конца — 309 пн. При этом использовали две плазмиды интеграции — pAc373 и pAc380 (см. рис. 15.1). Гибридный вирус Ac373-IL2 обеспечивал в клетках *S. frugiperda* более высокий уровень продукции интерлейкина ($1{,}1 \cdot 10^8$ е. а./л), чем вирус Ac380-IL2 ($3 \cdot 10^7$ е. а./л). Различие данных конструкций состоит в том, что в первой гибридный ген IL-2 содержит на 5′-конце 41 пн лидерной (некодирующей) последовательности гена полиэдрина, в то время как во второй такая последовательность перед геном

```
                                 мРНК
           -60              -40                 -20                +1
AcNPV ... TAACCATCTCGCAAATAAATAAGTATTTTACTGTTTTCGTAACAGTTTTGTAATAAAAAAACCTATAAATATGCCGGATTATT
pAcRP1 ... TAACCATCTCGCAAATAAA
pAcRP7 ... TAACCATCTCGCAAATAAATAAGT
pAcRP5 ... TAACCATCTCGCAAATAAATAAGTATTTTACTGTTTTCG
pAcRP6 ... TAACCATCTCGCAAATAAATAAGTATTTTACTGTTTTCGTAACAGTTTTGTAATAAAAAAACC
pAc373 ... TAACCATCTCGCAAATAAATAAGTATTTTACTGTTTTCGTAACAGTTTTGTAATAAAAAAACC
                                                                                  +1
pAcYM1 ... TAACCATCTCGCAAATAAATAAGTATTTTACTGTTTTCGTAACAGTTTTGTAATAAAAAAACCTATAAATA

          +20             +180                  +740
AcNPV  CATACCG................GAGGATCCTTTCCT....................TAAAACACGATACATTGTTATTA...
pAcRP1                        CCGGATCCTTTCCT....................TAAAACACGATACATTGTTATTA...
pAcRP7                        CCGGATCCTTTCCT....................TAAAACACGATACATTGTTATTA...
pAcRP5                        CCGGATCCTTTCCT....................TAAAACACGATACATTGTTATTA...
pAcRP6                        CCGGATCCTTTCCT....................TAAAACACGATACATTGTTATTA...
pAc373                CGAGATCCGCGGATCCTTTCCT....................TAAAACACGATACATTGTTATTA...
pAcYM1                                                                  CGGATCCGGTTATTA...
```

Рис. 15.2. Нуклеотидная последовательность плазмид интеграции в районе встроенного в ген полиэдрина *Bam*HI-линкера. Инициаторный и терминаторный триплеты обведены рамкой. Последовательность линкера подчеркнута. Пробелы в последовательностях обозначают делецию

интерлейкина отсутствует. Эти эксперименты продемонстрировали, что лидерная последовательность мРНК полиэдрина важна для экспрессии чужеродных генов.

С помощью гибридных бакуловирусов удалось добиться существенно более эффективной продукции интерферона и интерлейкина, чем в других генно-инженерных системах, экспрессирующих эти целевые белки. Тем не менее в инфицированных клетках насекомых синтез полиэдрина вирусом дикого типа значительно превосходил продукцию чужеродных белков. Поэтому возникла необходимость исследовать генетические факторы, влияющие на уровень экспрессии чужеродных генов в составе гена полиэдрина AcNPV. С этой целью был получен набор плазмид интеграции серии pAcRP, в которых участок гидролиза рестриктазой *Bam*HI расположен на разном расстоянии от точки инициации транскрипции гена полиэдрина, а часть кодирующей последовательности делетирована (рис. 15.2). Встройка кДНК гена гемагглютинина вируса гриппа в векторы интеграции данной серии показала, что в зависимости от размера 5′-концевой лидерной последовательности мРНК полиэдрина, присутствующей в мРНК гибридных генов гемагглютинина, варьирует уровень продукции чужеродного белка в инфицированных клетках (табл. 15.1).

Схожие результаты были получены при встройке гена белка N вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) в плазмиды pAcRP1, pAcRP5 и pAcRP6 (см. рис. 15.2). При инфицировании клеток *S. frugiperda* гибридными вирусами оказалось, что pAcRP6-производный вирус YN2 синтезировал на порядок больше LCMV-специфичной мРНК и в 10–20 раз больше целевого белка, чем pAcRP5-производный вирус YN12. Для вируса на основе плазмиды pAcRP1 не удалось выявить LCMV-специфичной мРНК. Аналогичный эффект наблюдали также при встройке гена белка GPC вируса LCMV.

Учитывая, что чем меньше делеция 5′-концевой лидерной последовательности гена полиэдрина, тем выше уровень экспрессии чужеродного гена, решено было создать вектор интеграции, у которого полностью сохранен данный участок мРНК полиэдрина. В результате ряда генно-инженерных манипуляций в лаборатории Д. Бишопа в 1987 г. сконструировали плазмиду интеграции pAcYM1 (см. рис. 15.2), у которой полностью делетирована кодирующая последовательность гена полиэдрина, а также 13 пн сразу за терминаторным триплетом TAA. При этом

Таблица 15.1. **Экспрессия гена гемагглютинина вируса гриппа гибридными бакуловирусами, полученными с помощью плазмид интеграции**

Плазмида	Активность гемагглютинина	Граница делеции 5′-концевой лидерной последовательности мРНК[1]
pAcRP6	160	– 7
pAcRP5	40	– 31
pAcRP7	10	– 46
pAcRP1	0	– 51

Примечание. Активность гемагглютинина определялась в 10^6 инфицированных клеток *S. frugiperda* через 30 ч после инфекции.

[1] Точка инициации транскрипции гена полиэдрина находится в положении – 49.

в pAcYM1 сохранена природная последовательность 5′-концевого лидерного участка вплоть до нуклеотидного остатка A (+1), а также сигналы терминации транскрипции и полиаденилирования мРНК гена полиэдрина.

После встройки генов *N* и *GPC* вируса лимфоцитарного хориоменингита в плазмиду pAcYM1 были получены гибридные бакуловирусы YM1YN1 и YM1YG1, которые детерминировали значительно более высокий уровень продукции белков LCMV, чем ранее полученные варианты YN2 и YG6. Кроме того, с помощью других вариантов гибридных вирусов доказано, что делеция 3′-концевой части структурного гена полиэдрина, осуществленная при создании pAcYM1, не влияет на уровень экспрессии чужеродного гена.

В лаборатории М. Саммерса в 1988 г. изучили влияние транскрипционных и трансляционных сигналов, необходимых для эффективной экспрессии генов хлорамфениколацетилтрансферазы, β-галактозидазы *E. coli* и активатора тканевого плазминогена человека при встройке в район гена полиэдрина AcNPV. Наивысший уровень мРНК и белков, кодируемых чужеродными генами, наблюдали в тех случаях, когда 5′-концевая часть кодирующей последовательности гена полиэдрина была слита в правильной фазе трансляции с целевыми генами. При этом для очень высокого уровня продукции достаточно, чтобы на N-конце химерного белка присутствовало 12 АК полиэдрина. Используя такой подход, в клетках насекомых впервые удалось достичь продукции чужеродных белков, сравнимой с продукцией полиэдрина. По-

лученные суперпродуценты образовывали в инфицированных клетках большие вакуоли. Эти вакуоли были значительно крупнее, чем полиэдры, которые формирует в ядре AcNPV дикого типа. Диаметр клеток, инфицированных гибридными бакуловирусами, превышал в 1,5–2 раза диаметр неинфицированных клеток.

Необходимо подчеркнуть, что и при менее эффективной экспрессии генов, встроенных в AcNPV, уровень синтеза целевых белков настолько высок, что они находятся в цитоплазме в агрегированном состоянии, образуя в зависимости от природы белка множественные тела включения или вакуоли.

Кроме высокой продуктивности важной характеристикой генно-инженерной системы бакуловирусов является то, что эукариотические сигналы посттрансляционной модификации белков узнаются ферментами клеток насекомых. В многочисленных работах показано, что в таких системах происходит правильное отщепление сигнальных пептидов и секреция целевых белков в среду или на поверхность клеток, инфицированных гибридными бакуловирусами, фосфорилирование и гликозилирование белков. При этом оказалось, что в клетках насекомых белки гликозилируются в основном так же, как и в клетках млекопитающих, за исключением того, что у них не образуются сложные типы гликанов. Однако эти небольшие различия, по-видимому, могут иметь значение лишь для ограниченного числа белков. Так, при клонировании гена эритропоэтина человека в составе AcNPV Д. Войховский с соавторами (1987 г.) обнаружили, что в клетках *S. frugiperda* происходит гликозилирование данного чужеродного белка, но только олигосахаридами ограниченного размера. Молекулярная масса эритропоэтина оказалась меньше, чем ожидалось (23 кДа вместо 30 кДа), тем не менее полученный с помощью бакуловируса гормон человека обладал полной биологической активностью.

Очень интересный результат получили в лаборатории М. Саммерса в 1989 г. В состав генома AcNPV под контроль промотора гена полиэдрина была встроена ДНК-копия молекулы 26S РНК вируса Синдбис, являющегося представителем семейства Togaviridae. Для этих вирусов характерно, что с субгеномной 26S РНК транслируется полипротеин, который затем подвергается последовательному протеолитическому расщеплению с образованием отдельных структурных белков вириона. Процессинг белка-предшественника осуществляется протеазами клетки-хозяина. В связи с этим возникает вопрос о том, будет ли происходить такой процессинг в культуре клеток насекомых, т. е. в чужеродной системе. Оказалось, что кДНК молекулы 26S РНК эффективно транскрибируется в составе гибридного генома бакуловируса. Более того, удалось обнаружить, что полипротеин правильно процессируется с образованием структурных вирусных белков. Таким образом, рассматриваемая генно-инженерная система кроме высокой продуктивности может обеспечивать правильный процессинг чужеродных эукариотических белков.

Помимо посттрансляционных модификаций в клетках насекомых обычно происходит и правильная (соответствующая природной) укладка чужеродных белков. Например, В. Мэрфи с соавторами (1990 г.) сконструировали гибридный AcNPV, детерминирующий синтез химерного белка, состоящего из доменов двух протективных белков малярийного плазмодия. Причем антигенные свойства химерного белка в значительной степени зависят от правильного образования дисульфидных связей между остатками цистеина и укладки полипептидной цепи. Это обусловлено, в частности, тем, что одна из иммуногенных детерминант химерного белка является конформационной, т. е. очень чувствительной к изменению третичной структуры белка. Синтез в клетках *E. coli* не позволил получить полноценный белок, и он был слабоиммуногенен. В клетках же насекомых продуцируемый белок подвергался правильной укладке с образованием дисульфидных связей, что значительно усиливало его иммуногенные свойства. Данный искусственный белок можно рассматривать как потенциальную субъединичную вакцину против малярии.

Для некоторых генов, клонированных в составе AcNPV, возможен правильный сплайсинг мРНК. Однако, по-видимому, предпочтительнее использовать непрерывные кодирующие последовательности целевых генов.

Успехи экспериментов по клонированию и экспрессии чужеродных генов в составе гена полиэдрина вируса ядерного полиэдроза калифорнийской совки (табл. 15.2) демонстрируют перспективность применения данного вектора для эффективной продукции белков самого различного происхождения. В настоящее время бакуловирусная система суперпродукции чужеродных белков является неотъемлемой частью многих генно-инженерных исследований.

В качестве альтернативного сильного промотора можно использовать δ-промотор гена белка p10. Используя клонированный *Eco*RI-P-фраг-

Таблица 15.2. **Примеры экспрессии чужеродных генов в составе генома вируса ядерного полиэдроза калифорнийской совки**

Плазмида интеграции	Продукты чужеродного гена	Плазмида интеграции	Продукты чужеродного гена
pAc380	Фибробластный интерферон человека	pAc373	Глюкоцереброзидаза человека Белок T11 человека
pAc360	β-Галактозидаза *E. coli* Хлорамфениколацетилтрансфераза *E. coli*	pAcRP5	Гемагглютинин вируса гриппа
pAc373	Интерлейкин 2 человека Белок c-myc человека Гемагглютинин вируса чумы птиц Эритропоэтин человека Белок env вируса иммунодефицита человека	pAcRP6	Белки GPC и N вируса лимфоцитарного хориоменингита Поверхностный антиген вируса гепатита B Белок VP2 вируса синего языка
	Белок p40* вируса иммунодефицита человека t-Антиген вируса SV40	pAc610	Белки gag вируса иммунодефицита человека
	Белки PB1, PB2 и PA полимеразного комплекса вируса гриппа Структурные белки и белок NS1 вируса Денге	pAcYM1	Белок NS1 вируса синего языка Капсидный белок вируса Хантаан
	Протеин-тирозин киназный домен рецептора инсулина человека	pVL941	T-антиген вируса SV40
	β-Фазеолин *Phaseolus vulgaris*	pAc436	Белок VP1 вируса гепатита A

мент AcNPV, Дж. Влак с соавторами (1988 г.) создали плазмиду интеграции pAcR159Z. В данной плазмиде к последовательности, кодирующей первые 51 АК p10, подстроили в правильной рамке трансляции фрагмент гена *lacZ*, кодирующий 1015 АК β-галактозидазы *E. coli*. После котрансфекции клеток гибридной плазмидой pAcR159Z с ДНК вируса дикого типа отобрали клоны гибридных вирусов по синей окраске вирусных бляшек на среде с Xgal. Электронная микроскопия показала, что полученный гибридный вирус AcNPV/p10Z-2 при инфицировании чувствительных клеток формирует полиэдры, однако в ядрах клеток отсутствуют скопления волокон и электронно-плотные образования, характерные для вируса дикого типа. Кроме того, полиэдры не покрыты полисахаридной мембраной. Вместо этого в ядрах выявляются ассоциированные с полиэдрами большие гранулярные структуры, состоящие из химерного белка p10–Gal. Эффективность размножения гибрида AcNPV/p10Z-2 на культуре клеток не отличалась от таковой для вируса дикого типа, а следовательно, ген p10 несуществен для репликации бакуловируса. Интересно отметить, что биологическая активность у гибридного вируса была достоверно выше, чем у исходного (при оценке LD_{50} для личинок *S. eigua*, нормированной по дозе полиэдров).

П. Киттс с соавторами (1990 г.) предложили интересный подход, позволяющий после котрансфекции получать вирусное потомство AcNPV, обогащенное гибридными вариантами. В целевое место встройки на вирусном геноме вводят сайт гидролиза крупнощепящей рестриктазы, для которой мест узнавания на ДНК AcNPV нет. Так, в плазмиду pAcRP6 (см. рис. 15.2) по сайту *Bam*HI встроили синтетический линкер:

```
BamHI       BamHI
GATCCCTTAGG
    GGAATCCCTAG
     Bsu36I
```

Полученная гибридная плазмида pAcRP6-SC (от англ. single cut) содержит сайт гидролиза рестриктазой *Bsu*36I, для которой нет участков узнавания на вирусной ДНК. После котрансфекции чувствительных клеток нативной ДНК AcNPV и плазмидой pAcRP6-SC был получен полиэдрин-негативный гибридный вирус AcRP6-SC. ДНК этого вируса под действием *Bsu*36I расщепляется в единственном месте в районе делеционного варианта гена полиэдрина. ДНК AcRP6-SC использовали в экспериментах по котрансфекции с плазмидой pAcRP23-*lacZ*, содержащей экспрессируемый ген *lacZ E. coli* под контролем сигналов гена полиэдрина. Оказалось, что инфекционность ДНК

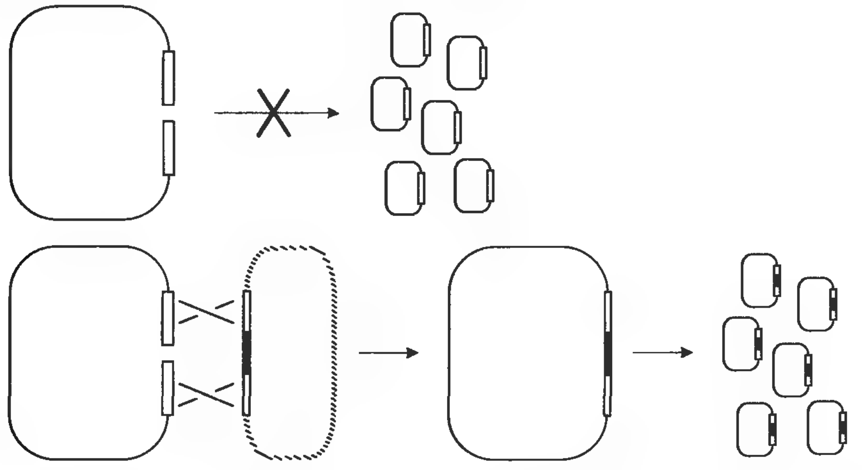


Рис. 15.3. Схема спасения линейной ДНК вируса ядерного полиэдроза калифорнийской совки плазмидой интеграции за счет рекомбинации молекул ДНК по областям гомологии

AcRP6-SC, гидролизованной *Bsu*36I, снижается на 2 порядка. Однако выход гибридных вирусов при котрансфекции линейной вирусной ДНК и целевой плазмидой увеличивается в 10 раз и достигает 9–23 % (вместо 0,8–2,3 % при обычной схеме эксперимента). Аналогичные результаты были получены и для гена белка p10. Таким образом, данный подход является общим и может быть использован при встройке чужеродных генов в любые заранее выбранные места вирусного генома.

Схема, объясняющая полученные результаты, представлена на рис. 15.3. ДНК вируса ядерного полиэдроза способна реплицироваться лишь в кольцевой форме. Поэтому после котрансфекции гидролизованной линейной вирусной ДНК и плазмидой интеграции, перекрывающей это место гидролиза, выживают (спасаются) только те вирусные геномы, которые в клетке смогли замкнуться в кольцо. Существенная часть вирусных молекул переходит в кольцевую форму в результате их рекомбинации с плазмидой.

Несомненный интерес представляет возможность создания бакуловирусного вектора, направляющего эффективный синтез двух или более чужеродных белков. Первым шагом к решению данной проблемы явилось конструирование К. Эмери и Х. Бишопом в 1987 г. плазмиды pAcVC2 (рис. 15.4), в которой промотор гена полиэдрина присутствует в двух копиях, направленных противоположно. При этом в одном случае он обеспечивает экспрессию гена полиэдрина, а в другом — чужеродного гена белка N вируса лимфоцитарного хориоменингита. Котрансфекция клеток *S. frugiperda* плазмидой pAcVC2 и ДНК гибридного полиэдрин-негативного вируса приводила к появлению полиэдрин-позитивных бляшек AcNPV с частотой 0,1–1 %. Отобранные таким образом гибридные вирусы детерминировали на позднем этапе инфекции одновременный синтез полиэдрина и белка N LCMV. Электронной микроскопией было показано наличие вируссодержащих полиэдров в ядрах клеток, инфицированных гибридным AcNPV, и присутствие в цитоплазме этих клеток агрегатов белка N LCMV.

Данное направление исследований развили П. Рой с сотрудниками (1990–1993 гг.) при экспрессии генов структурных белков вируса синего языка (bluetongue virus, BTV). Геном данного реовируса состоит из 10 сегментов двухцепочечной РНК. В состав вириона входят 7 белков, из них три (VP1, VP4 и VP6) являются минорными компонентами. Белки VP3 и VP7 образуют сердцевину, а VP2 и VP5 формируют наружную белковую оболочку вириона. Были сконструированы гибридные AcNPV, экспрессирующие пары белков: VP3–VP7 и VP2–VP5. При инфицировании клеток насекомых бакуловирусом, синтезирующим VP3 и VP7, формировались сердцевиноподобные частицы. Если же клетки заражали обоими гибридными бакуловирусами, продуцирующими все четыре основных белка вируса синего языка, то наблюдалось образование не только сердцевиноподобных частиц, но и двухоболочечных вирусоподобных частиц.

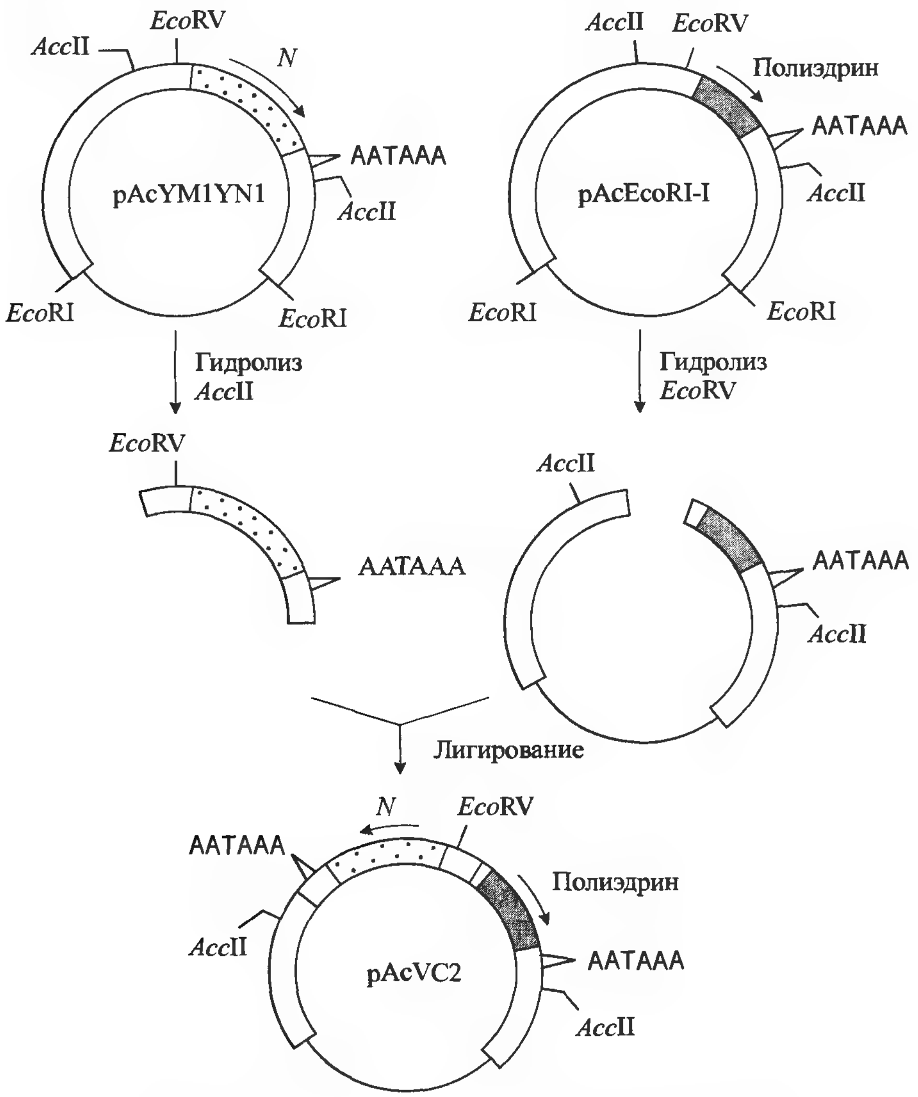


Рис. 15.4. Схема конструирования плазмиды pAcVC2

На следующем этапе была создана плазмида интеграции pAcAB4 (рис. 15.5), предназначенная для встройки четырех чужеродных генов под контроль промоторов генов полиэдрина и белка p10. В данную плазмиду встроили ДНК-копии сегментов РНК, кодирующих белки VP2, VP3, VP5 и VP7 вируса синего языка. Используя эту гибридную плазмиду, получили бакуловирус, продуцирующий одновременно все четыре белка реовируса. При инфицировании клеток насекомых данным гибридным AcNPV с высокой эффективностью образовывались вирусоподобные частицы вируса синего языка без примеси сердцевиноподобных частиц (что происходило при совместной инфекции клеток двумя бакуловирусами, экспрессирующими по паре белков реовируса).

Рассмотренные подходы к созданию гибридных вариантов AcNPV могут быть распространены на другие бакуловирусы. Наибольшего успеха удалось достичь на вирусе ядерного полиэдроза тутового шелкопряда *Bombyx mori* (BmNPV). Тутовый шелкопряд в течение тысячелетий адаптирован человеком для массового выращивания, и в настоящее время имеются компьютеризованные линии, предназначенные для культивирования его в больших количествах. Поэтому бакуловирус BmNPV интересен прежде всего тем, что созданные на его основе гибриды можно культивировать на личинках насекомых, а это является многообещающим биотехнологическим подходом, так как данная система проще и дешевле культуры клеток насекомых.

С. Маеда с соавторами (1985 г.) клонировали в составе плазмиды pBR322 *Eco*RI-фрагмент ДНК (10,5 тпн), содержащий ген полиэдрина BmNPV, и расшифровали его нуклеотидную последовательность. Это позволило затем, используя рестриктазы и нуклеазу Bal31, создать

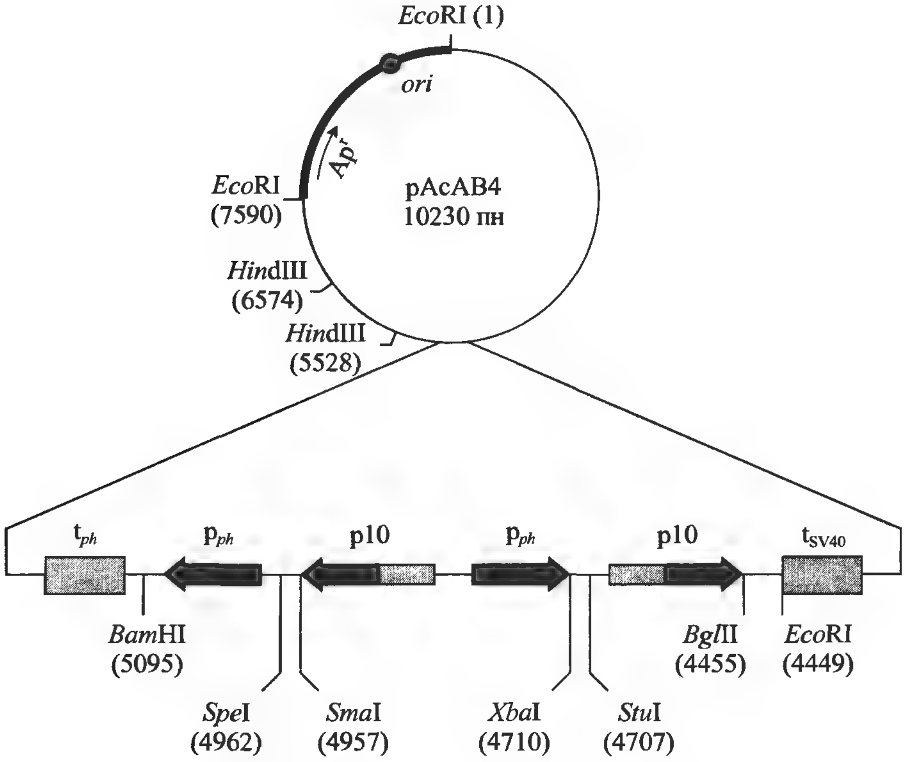


Рис. 15.5. Плазмида интеграции pAcAB4.

Черными стрелками отмечены промоторы генов полиэдрина и белка p10, серыми блоками — районы потенциальных сигналов терминации транскрипции. На кольцевой плазмиде тонкой линией обозначен *Eco*RI-I-фрагмент ДНК AcNPV; толстой — плазмида pUC8

на основе pUC8 и pUC9 набор векторных плазмид серии p89B, напоминающих плазмиды интеграции серии pAc. В плазмидах серии p89B полностью удалена кодирующая последовательность гена полиэдрина и имеются различные по протяженности делеции 5′-концевого лидерного участка этого гена. На основе данных векторов в 1987 г. были сконструированы гибридные плазмиды со встройкой кДНК α-интерферона человека в разные точки гена полиэдрина BmNPV. В результате рекомбинационной интеграции, используя созданные плазмиды, получили набор гибридных бакуловирусов.

Анализ продукции интерферона в культуре клеток или в личинках тутового шелкопряда, инфицированных гибридными вариантами BmNPV, показал, что наибольший уровень чужеродного белка достигается при полном сохранении в гибридном гене 5′-концевой лидерной некодирующей последовательности гена полиэдрина (табл. 15.3). Однако и в этом случае продукция интерферона достигала лишь 1 % от уровня полиэдрина, синтезируемого вирусом дикого типа.

В 1988 г. сотрудникам той же лаборатории удалось определить условия, при которых чужеродный белок производился гибридным BmNPV в количествах, сопоставимых с количеством полиэдрина, синтезируемого исходным бакуловирусом. Оказалось, что для столь эффективной продукции, как и у AcNPV, необходимо, чтобы чужеродный белок содержал в своем составе N-концевую последовательность полиэдрина, т. е. чтобы синтезировался химерный белок. Как видим, генетические факторы, влияющие на уровень экспрессии чужеродных белков, одинаковы для AcNPV и BmNPV.

Таблица 15.3. **Продукция интерферона человека в культуре клеток BM-N и личинках тутового шелкопряда**

Гибридный вирус	Активность интерферона, е. а./мл		Район встройки гена IFN[1]
	Клетки BM-N	Гемолимфа личинок	
BmBM034-H7	$1 \cdot 10^7$	$1,9 \cdot 10^8$	+ 1
BmIFN2B310	$5 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^7$	– 19
BmIFN2B241	$3 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6$	– 29
BmIFN2B323	$5 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^5$	– 48
BmIFN2B587	$< 10^3$	$< 10^3$	– 82

[1] Точка инициации транскрипции гена полиэдрина BmNPV находится в положении –50.

Другой бакуловирус, на котором в 1987 г. начаты генно-инженерные эксперименты, — вирус ядерного полиэдроза вощинной моли *Galleria mellonella* (GmNPV). В ген белка p10 данного вируса встроили ген устойчивости к неомицину *neo* и показали, что гибридные варианты GmNPV можно отбирать на селективной среде по устойчивости к антибиотику широкого спектра действия генетицину (G-418).

В настоящее время бакуловирусы очень широко используются в качестве экспрессирующих векторов для эффективной продукции эукариотических белков в культурах клеток или организме насекомых. При этом следует подчеркнуть, что для ряда бакуловирусов имеются технологии препаративного культивирования, поскольку они используются как инсектицидные препараты в сельском хозяйстве. Это обеспечивает хорошую базу для быстрого создания технологий наработки целевых белков, продуцируемых гибридными бакуловирусами.

15.3. УПРОЩЕННАЯ СИСТЕМА СОЗДАНИЯ ГИБРИДНЫХ БАКУЛОВИРУСОВ Bac-to-Bac

Ранее получение гибридных бакуловирусов основывалось на рекомбинации по участкам гомологии нативной вирусной ДНК и гибридной плазмиды, в которой целевой ген фланкирован последовательностями ДНК из определенного района вирусного генома. Но данный метод требовал больших затрат времени — 1–1,5 мес. В. Лукоу с соавторами в 1993 г. разработали новый, более быстрый и эффективный метод получения гибридных бакуловирусов. Его принцип основан на сайтспецифической транспозиции целевого гибридного гена из плазмиды в бакуловирусную бакмиду, размножаемую в клетках *E. coli*. Бакмида представляет собой полную копию вирусной ДНК, соединенную с низкокопийным мини-F репликоном, геном устойчивости к канамицину и сегментом ДНК *lacZα*, кодирующим α-донорный пептид β-галактозидазы (см. 2.2.6), перенесенным из плазмиды серии pUC. При этом в N-концевую кодирующую часть гена *lacZα* встроили без нарушения рамки трансляции (и способности к α-комплементации β-галактозидазы) участок интеграции транспозона Tn*7* (мини-*att*Tn*7*). Бакмида размножается в клетках *E. coli* как большая низкокопийная плазмида, обеспечивает устойчивость к канамицину и α-комплементацию мутантной формы β-галактозидазы, синтезируемой бактерией. Поэтому на среде с ИПТГ и Xgal колонии таких бактерий окрашиваются в синий цвет.

Кроме бакмиды используемый штамм *E. coli* содержит так называемую хелперную плазмиду (помощник), обеспечивающую функцию транспозиции Tn*7* и устойчивость к тетрациклину.

Целевые гены встраивают под контроль сильного промотора гена полиэдрина в плазмиду интеграции pFastBac (рис. 15.6), которая несет также детерминанты устойчивости к гентамицину и ампициллину. После трансформации клеток *E. coli* DH10Bac гибридной плазмидой интеграции в результате сайтспецифической транспозиции целевого гена в бакмиду получается рекомбинантная бакмида (рис. 15.7) с нарушенным геном *lacZα*, т. е. на питательной среде с антибиотиками гентамицином, канамицином и тетрациклином, а также с ИПТГ и Xgal вырастают колонии с гибридными бакмидами, имеющие белый цвет.

Бакмиду выделяют из бактериальных клеток, анализируют правильность встройки и затем трансфицируют в культуру клеток насекомых. Все вирусы, образовавшие бляшки на монослое клеток, являются гибридными.

Этот метод позволяет существенно сократить время, требующееся для получения рекомбинантного вируса, — от 4–6 недель до 7–10 дней. Данная система получила название Bac-to-Bac и распространяется фирмой «Life Technologies» (США).

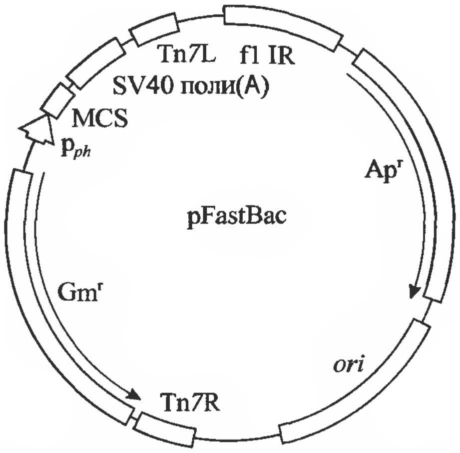


Рис. 15.6. Векторная экспрессионная плазмида pFastBac, предназначенная для направленной встройки целевых генов в бакмиду, содержащую геном вируса ядерного полиэдроза. MCS — полилинкер для встройки целевого гена

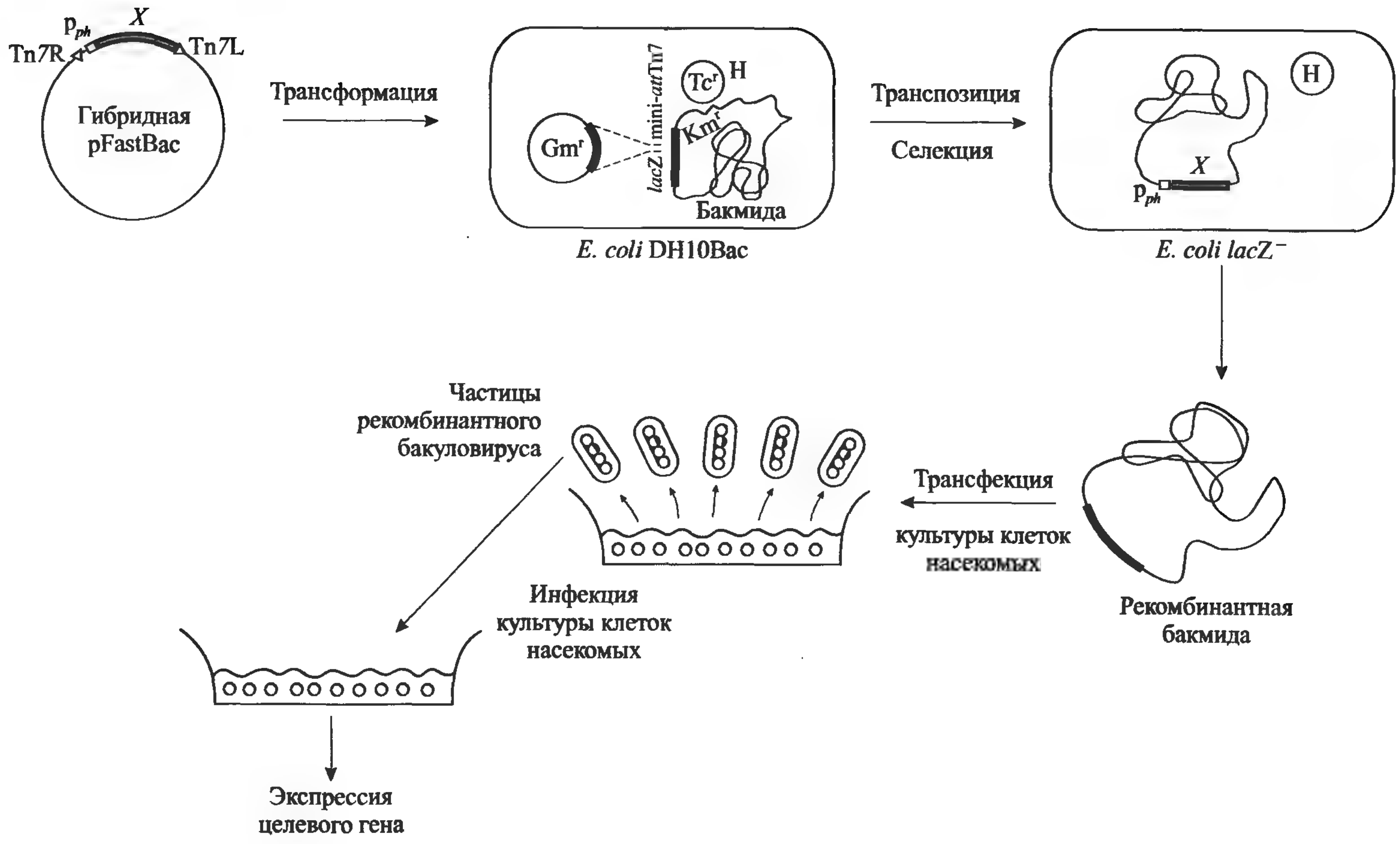


Рис. 15.7. Схема встройки чужеродного гена в состав геномной ДНК вируса ядерного полиэдроза в клетках *E. coli* и получения клонов рекомбинантных бакуловирусов.

X — целевой ген; Н — хелперная плазмида

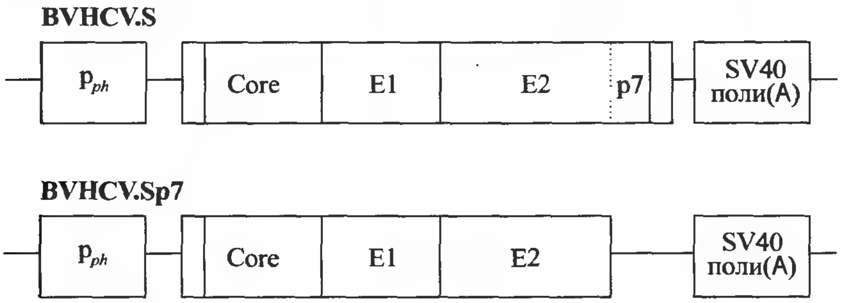


Рис. 15.8. Карта сегментов генома вируса гепатита С человека, встроенных в рекомбинантные бакуловирусы

Примером использования данной векторной системы является работа, которую выполнили Т. Бумерт с соавторами (1998 г.). В состав плазмиды транспозиции pFastBac встроили кДНК структурных белков вируса гепатита С (HCV) (рис. 15.8). При заражении культуры клеток насекомых гибридными бакуловирусами выявили не только синтез структурных белков HCV, но и сборку вирусоподобных частиц, покрытых оболочкой. При этом обнаружилось, что белок p7 (см. рис. 15.8) для сборки частиц не требуется. Важность полученных результатов определяется низкой концентрацией HCV в организме инфицированных людей, отсутствием систем культивирования этого вируса в культурах клеток и удобной животной модели данной инфекции. Все это значительно усложняет изучение свойств HCV и разработку противовирусной вакцины. Возможно, на основе получаемых в бакуловирусной системе вирусоподобных частиц HCV удастся создать эффективную вакцину против этой инфекции.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Щелкунов С.Н. Высокоэффективная система экспрессии клонированных генов на основе бакуловирусов // Успехи соврем. биологии. 1990. Т. 110. С. 338–350.

Baumert T. F., Ito S., Wong D. T., Liang T. J. Hepatitis C virus structural proteins assemble into virus-like particles in insect cells // J. Virol. 1998. Vol. 72. P. 3827–3836.

Belyaev A. S., Roy P. Development of Baculovirus triple and quadruple expression vectors: co-expression of three or four bluetongue virus proteins and the synthesis of bluetongue virus-like particles in insect cells // Nucl. Acids Res. 1993. Vol. 21. P. 1219–1223.

Bogner E., Radsak K., Stinski M. F. The gene product of human cytomegalovirus open reading frame UL56 binds the pac motif and has specific nuclease activity // J. Virol. 1998. Vol. 72. P. 2259–2264.

Brentano L., Noah D. L., Brown E. G., Sherry B. The reovirus protein $\mu 2$, encoded by the M1 gene, is an RNA-binding protein // J. Virol. 1998. Vol. 72. P. 8354–8357.

Cameron I. R., Possee R. D., Bishop D. L. Insect cell culture technology in baculovirus expression systems // Trends Biotechnol. 1989. Vol. 7. P. 66–70.

Chisholm G. E., Henner D. J. Multiple early transcripts and splicing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene // J. Virol. 1988. Vol. 62. P. 3193–3200.

Glass P. J., Zeng C. Q., Estes M. K. Two nonoverlapping domains on the norwalk virus open reading frame 3 (ORF3) protein are involved in the formation of the phosphorylated 35K protein and in ORF3-capsid protein interactions // J. Virol. 2003. Vol. 77. P. 3569–3577.

Iatrov K., Meidinger R. G. Tissue-specific expression of silkmoth chorion genes *in vivo* using *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus as a transducing vector // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1990. Vol. 87. P. 3650–3654.

Luckow V. A., Lee S. C., Barry G. F., Olins P. O. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into baculovirus genome propagated in *Escherichia coli* // J. Virol. 1993. Vol. 67. P. 4566–4579.

Murphy V. F., Rowan W. C., Page M. J., Holder A. A. Expression of hybrid malaria antigens in insect cells and their engineering for correct folding and secretion // Parasitology. 1990. Vol. 100. P. 177–183.

Whitbeck J. C., Connolly S. A., Willis S. H. et al. Localization of the gD-binding region of the human herpes simplex virus receptor, HveA // J. Virol. 2001. Vol. 75. P. 171–180.

Глава 16
ВЕКТОРНАЯ СИСТЕМА НА ОСНОВЕ ТРАНСПОЗОНОВ ЭУКАРИОТ

В начале 1950-х гг. Б. Мак-Клинток на основе данных генетических экспериментов, выполненных на кукурузе, постулировала наличие в геноме высших эукариот подвижных генетических элементов. Лишь спустя два десятилетия при анализе некоторых мутаций дрозофилы предположили наличие у нее аналогичных генетических элементов. В результате экспериментов по гибридизации *in situ* политенных хромосом слюнных желез *Drosophila melanogaster* с клонированными повторяющимися последовательностями хромосомной ДНК дрозофилы удалось доказать, что эти последовательности могут менять свое положение в геноме. Эти работы дали толчок многочисленным исследованиям подвижных генетических элементов эукариот, и в первую очередь дрозофилы.

Описаны следующие типы подвижных генетических элементов дрозофилы:

- *Copia*-подобные, или mdg-элементы, по своей организации во многом схожие с провирусами ретровирусов (см. 14.6.1): содержат прямые длинные концевые повторы, несущие промоторные области, могут находиться в автономной кольцевой форме, а при встраивании в хромосому генерируют короткие прямые дупликации. Обычно присутствуют в 20–40 копиях на гаплоидный геном мух и в 150–200 копиях на клетку в культуре клеток *Drosophila*. Подвижные элементы такого типа обнаружены также в дрожжах и растениях.
- FB-элементы — гетерогенны по размеру, но имеют длинные инвертированные повторы, консервативные по своей последовательности.
- Р-элементы — содержат короткие (31 пн) инвертированные повторы и при интеграции генерируют дупликацию участка 8 пн (рис. 16.1), размер их составляет 2,9 тпн.

Р-элементы обнаружены при исследовании молекулярных основ гибридного дисгенеза у *D. melanogaster*. Показано, что при скрещивании самцов штамма Р и самок штамма М (Р♂ × М♀) наблюдается дисгенез потомства, но такой эффект не выявляется при других типах скрещивания: М♂ × Р♀; Р♂ × Р♀ или М♂ × М♀. Это удалось легко объяснить после того, как доказали, что Р-штаммы содержат в геноме множественные (30–50) копии подвижных генетических элементов. В М-штаммах такие элементы отсутствуют. Транспозиция Р-элементов, репрессированная в штамме Р, активируется при попадании ДНК этих штаммов в М-цитотип. Это приводит к множественным инсерциям и делециям в геноме гибридных клеток и выражается в Р–М-дисгенезе. Р-элемент клонировали в составе плазмиды pBR322 и определили его нуклеотидную последовательность. Также были выявлены варианты Р-элемента с делециями во внутренней области, не способные к транспозиции. Однако удалось показать, что при наличии в геноме наряду с делеционным вариантом и нативного Р-элемента транспозиция первого ус-

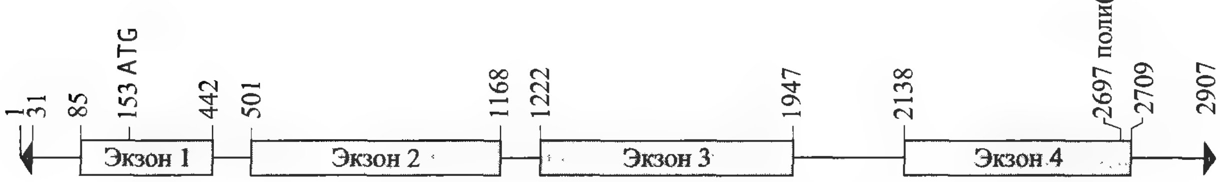


Рис. 16.1. Структура Р-элемента *D. melanogaster*.

Треугольниками обозначены короткие концевые инвертированные повторы

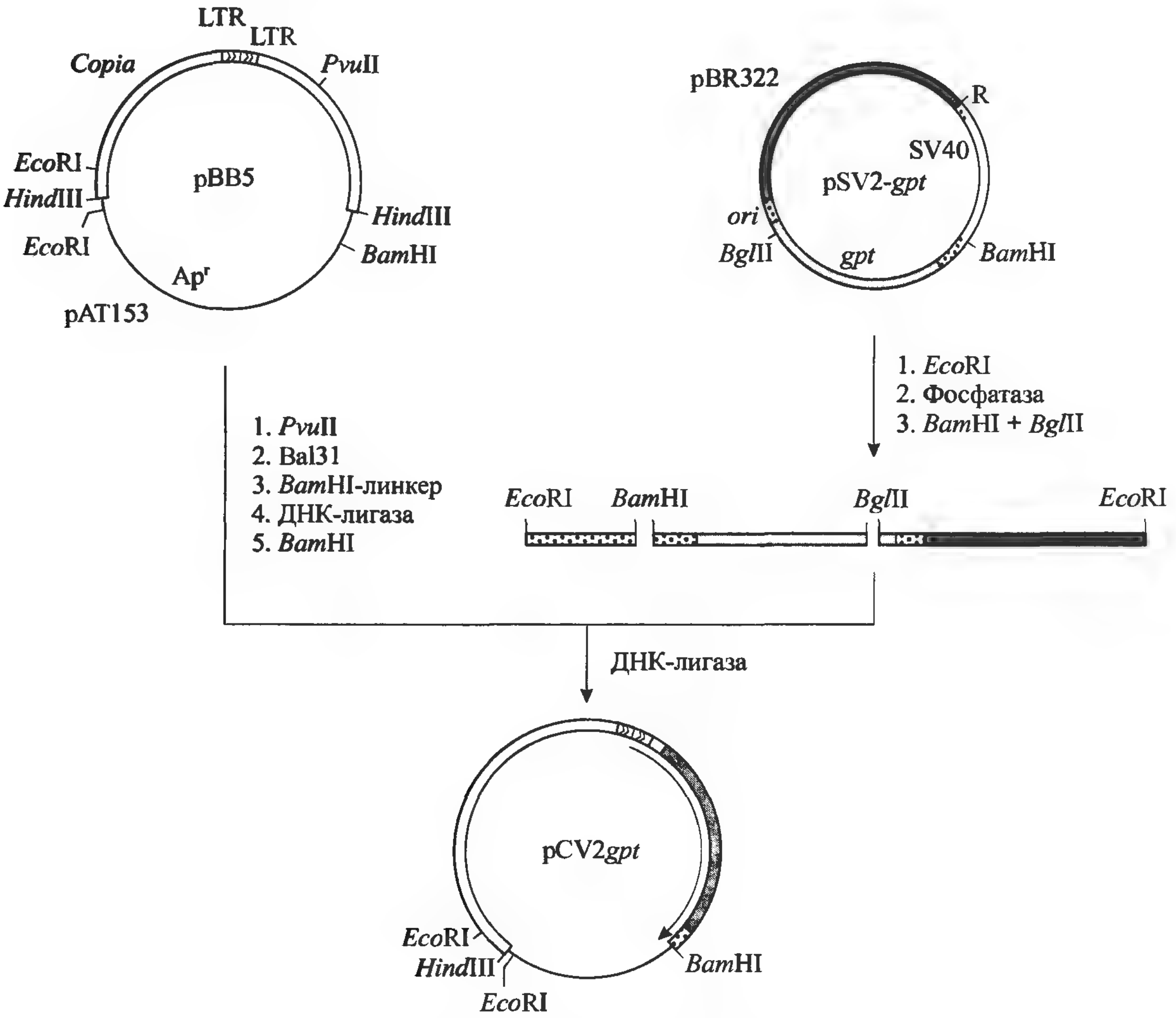


Рис. 16.2. Схема получения плазмиды pCV2*gpt*

пешно происходит за счет *транс*-функций Р-элемента. В результате дополнительных экспериментов локализован ген транспозазы, занимающий практически весь Р-элемент и состоящий из четырех экзонов (см. рис. 16.1). Все это демонстрирует удивительное сходство транспозонов эукариот с бактериальными транспозонами.

Как известно, в бактериях транспозоны легко могут переноситься с плазмид на бактериальную хромосому. Аналогичные данные А. Спрэдлинг и Г. Рубин получили в 1982 г. и для Р-элемента. Они сконструировали на основе pBR322 гибридную плазмиду pπ25.1, несущую полную копию Р-элемента. После инъекции данной плазмиды в ранние эмбрионы штамма *D. melanogaster*, не содержащего Р-элемента, оказалось, что около 50 % выживших эмбрионов имели в геноме 1–5 копий Р-элемента с различной локализацией на хромосомах. Причем последовательности плазмидной ДНК, прилегающие к Р-элементу, в геном клетки не интегрировались. Это доказывает, что в изученном случае происходил обычный перенос транспозона с одной молекулы ДНК на другую.

Данное наблюдение позволило разработать методологию эффективной интеграции любых генов в различные области генома эмбрионов дрозофилы. Во внутреннюю область Р-элемента, клонированного в бактериальной плазмиде, встраивается фрагмент чужеродной ДНК. Полученная гибридная плазмида, у которой в результате встройки нарушается ген транспозазы Р-элемента, инъецируется в эмбрионы дрозофилы совместно с исходной плазмидой, несущей нативный Р-элемент, который выполняет функции помощника транспозиции. Выжившие эмбрионы анализируют на наличие в хромосомах интегрированных копий гибридных Р-элементов. Оказалось, что 20–25% таких эмбрионов могут содержать чужеродную ДНК, интегрированную в составе гибридного элемента. Причем интеграция происходит в разные хромосомы и в различные участки одних и тех же хромосом. Нативный и дефектный гибридный

Р-элементы можно объединить в составе одной плазмиды. В этом случае уже нет необходимости использовать плазмиду-помощник.

Интеграция клонированных генов в различные области генома дрозофилы на ранних стадиях эмбриогенеза дает уникальную возможность исследовать эффект положения гена на его функционирование в процессе индивидуального развития эукариотического организма. Показано, что чаще всего интегрируются в геном раннего эмбриона единичные копии гибридного Р-элемента. При отсутствии нативного Р-элемента такие встройки затем стабильно сохраняют свою локализацию. Интеграция по разработанной схеме генов дрозофилы *rosy*, *Adh* и *Ddc* в разные хромосомы *D. melanogaster* не привела к изменению тканеспецифичности экспрессии этих генов. Лишь в некоторых случаях уровень синтеза соответствующих ферментов был изменен.

В 1987–1989 гг. в лаборатории В. Геринга разработали метод, позволяющий выявлять тканеспецифичную экспрессию репортерного гена *lac*Z, помещенного в составе Р-элемента под контроль его слабого промотора. Если в результате интеграционной трансформации дрозофилы происходит встройка репортерного гена вблизи тканеспецифичного усилителя транскрипции, то активная экспрессия гена *lac*Z будет происходить именно в этой ткани, что можно выявить при окраске внутренних органов дрозофилы реактивом Xgal. Встроив вместе с репортерным другой целевой ген, можно добиться его тканеспецифичной экспрессии. Такие исследования дают очень важную информацию для понимания того, как происходит регуляция функционирования генов в процессе индивидуального развития эукариотических организмов, тем более что обусловливаемая Р-элементом трансформация ранних эмбрионов может быть осуществлена во многих видах *Drosophila*.

Интересную векторную систему разработали Дж. Синклэйр с соавторами (1983 г.) на основе *copia*-элемента *D. melanogaster*. Выделена кольцевая внехромосомная форма данного элемента, гидролизована по единственному *Hin*dIII-участку и клонирована в составе pBR322. На основе полученной гибридной плазмиды pBB5 сконструировали плазмиду pCV2*gpt*, содержащую структурную часть гена *gpt E. coli*, встроенную под сигналы транскрипции тандема длинных концевых повторов *copia*-элемента (рис. 16.2). Оказалось, что pCV2*gpt* осуществляет эффективную генетическую трансформацию культуры клеток D1 дрозофилы. Более того, гибридная плазмида pCV2*gpt* реплицируется в клетках D1 и поддерживается в них в автономном состоянии в количестве одной-двух копий на клетку. В составе pCV2*gpt* можно клонировать и вводить в клетки дрозофилы другие чужеродные гены.

Как видим, наиболее хорошо изученные эукариотические транспозоны с успехом используют в качестве молекулярных векторов. Несомненно, более тщательное исследование транспозонов млекопитающих позволит создать и для них аналогичную векторную систему.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Щелкунов С. Н. Клонирование генов. Новосибирск: Наука, 1986. 228 с.

Жимулёв И. Ф. Трансформация у дрозофилы — новый экспериментальный подход в генетике // Соросовский образовательный журн. 2000. Т. 6, № 7. С. 11–16.

Spradling A. C., Rubin G. M. Transposition of cloned P-elements into *Drosophila* germ line chromosomes // Science. 1982. Vol. 218. P. 341–347.

Sinclair J. H., Sang J. H., Burke J. F., Ish-Horowicz D. Extrachromosomal replication of *copia*-based vectors in cultured *Drosophila* cells // Nature. 1983. Vol. 306. P. 198–200.

Wilson C., Pearson R. K., Bellen H. J. et al. P-element-mediated enhancer detection: an efficient method for isolating and characterizing developmentally regulated genes in *Drosophila* // Genes and Develop. 1989. Vol. 3. P. 1301–1313.

Глава 17
ПРОТИВОВИРУСНЫЕ ВАКЦИНЫ

Более 200 лет назад, 14 мая 1796 г., произошло знаменательное для медицины и всей биологической науки событие: английский медик Э. Дженнер в присутствии врачебной комиссии внес восьмилетнему мальчику в надрезы кожи на руке жидкость, взятую им из пузырьков, имевшихся на кистях рук женщины, заразившейся при дойке больной коровы оспой коров. Через несколько дней на месте надрезов образовались язвочки, у мальчика повысилась температура, появился озноб. Спустя некоторое время язвочки подсохли и покрылись сухими корочками, которые затем отпали, обнажив небольшие рубцы на коже. Ребенок полностью выздоровел.

Через месяц Э. Дженнер сделал весьма рискованный шаг: он заразил этого мальчика тем же способом, но уже гноем из накожных пузырьков от больного натуральной оспой. Однако мальчик не заболел. Тем самым было доказано, что человек, перенесший в легкой форме схожее заболевание — оспу коров, после выздоровления приобретает надежную защиту от такой грозной инфекции, как натуральная оспа. Возникающее состояние невосприимчивости к инфекционному заболеванию получило название иммунитет.

И хотя о природе возбудителей оспы коров и натуральной оспы в то время ничего не было известно, тем не менее метод прививок против оспы, предложенный Э. Дженнером и названный вакцинацией (от лат. vacca — корова), быстро получил широкое распространение. Так, в 1800 г. в Лондоне было вакцинировано уже 16 тыс. человек, а в 1801 г. — 60 тыс. Постепенно этот метод защиты от оспы завоевал всеобщее признание и стал применяться во многих странах.

Однако наука, изучающая механизмы формирования иммунитета, — иммунология — возникла лишь в конце XIX в. после открытия ряда бактерий, вызывающих инфекционные заболевания животных и человека. Для зарождения и развития иммунологии большое значение имели работы великого французского микробиолога Л. Пастера, который первым доказал, что микроб «убивающий» может стать микробом, «защищающим» от инфекции, если ослабить его патогенные свойства. В 1880 г. он доказал возможность профилактической иммунизации против куриной холеры ослабленным возбудителем, в 1881 г. провел сенсационный опыт по иммунизации коров против сибирской язвы. Но поистине знаменитым Л. Пастер стал после того, как 6 июля 1885 г. с помощью прививки ослабленным возбудителем бешенства спас жизнь мальчику, покусанному бешеной собакой.

В отличие от бактерий сибирской язвы и куриной холеры возбудителя бешенства Л. Пастер увидеть не мог, но со своими сотрудниками научился размножать его в мозге кроликов. Мозг умерших кроликов сушили, выдерживали определенное время, в результате чего добивались ослабления возбудителя. Как выражение признания заслуги Э. Дженнера в разработке метода иммунизации против оспы свой метод защиты от бешенства Л. Пастер также назвал вакцинацией. С тех пор все способы профилактического прививания против инфекционных заболеваний называют вакцинацией, а препараты, которые при этом используют, — вакцинами.

Важное открытие в 1890 г. сделали Э. Беринг с сотрудниками. Они обнаружили, что после иммунизации дифтерийным или столбнячным токсином в крови животных появляется некий фактор, способный нейтрализовать или разрушать соответствующий токсин и тем самым предотвращать заболевание. Вещество, которое вызывало обезвреживание токсина, назвали антитоксином, а затем был введен более общий термин — антитело. То, что вызывает образование этих антител, стали называть антигеном.

В настоящее время известно, что все позвоночные, от примитивных рыб до человека, об-

ладают высокоорганизованной иммунной системой, которая до конца еще не изучена. Антигены — это вещества, несущие признаки генетически чужеродной информации. Антигенность присуща прежде всего белкам, а также некоторым сложным полисахаридам, липополисахаридам и иногда препаратам нуклеиновых кислот. Антитела — это особые защитные белки организма, называемые иммуноглобулинами (см. рис. 4 на вклейке). Антитела способны связываться с антигеном, вызвавшим их образование, и инактивировать его. Агрегаты антиген–антитело в организме обычно удаляются специальными клетками-«мусорщиками» — фагоцитами, открытыми знаменитым русским ученым И. И. Мечниковым (1901 г.), либо разрушаются системой комплемента.

В то время как большинство бактериальных инфекций удается лечить с помощью антибиотиков, удовлетворительных методов лечения вирусных заболеваний практически не существует. Самым простым и надежным методом борьбы с вирусными инфекциями является иммунопрофилактика — вакцинация. Поэтому в данном разделе будут рассмотрены только те подходы, которые направлены на формирование иммунитета к вирусным инфекциям.

Вирусы являются очень мелкими микроорганизмами. Они столь малы и просто устроены, что могут размножаться только используя многочисленные макромолекулы клетки, необходимые для биосинтеза белков и нуклеиновых кислот. Поэтому вирусы осуществляют свою жизнедеятельность исключительно внутри живых клеток. Это могут быть отдельные клетки, например бактерии, или целые организмы. Вирусные частицы (вирионы) многообразны по своей морфологии, но все они обязательно содержат нуклеиновую кислоту, окруженную чехлом из большого числа белковых молекул. У некоторых видов вирусов частицы покрыты дополнительными оболочками, содержащими не только белки, но и липиды. Поверхностные белки вирусов обычно обладают выраженными иммуногенными свойствами, т. е. вызывают формирование иммунного ответа в зараженном организме.

При проникновении вируса в организм и развитии инфекционного заболевания в иммунной системе индуцируются процессы, направленные на инактивацию свободного вируса и уничтожение зараженных клеток, способных выделять инфекционный агент. Свободный вирус инактивируется прежде всего в результате взаимодействия с антителами, специфично связывающимися с поверхностными антигенами вирусных частиц. За выработку антител отвечают В-клетки иммунной системы (В-лимфоциты). Следует отметить, что в ответ на каждый антиген активируется размножение строго специфичных В-лимфоцитов, синтезирующих антитела, осуществляющие связывание этого антигена и выведение его из организма. Такой иммунитет называют гуморальным. Важнейшим механизмом уничтожения зараженных вирусом клеток, на поверхности которых представлены некоторые антигены вируса, является активация размножения специфичных Т-лимфоцитов, лизирующих эти клетки. Данный тип ответа иммунной системы называют клеточным иммунитетом. В результате прошедшей инфекции в организме переболевшего животного сохраняется небольшое количество сенсибилизированных В- и Т-лимфоцитов, которые при повторной инфекции таким же вирусом могут быстро размножаться и обеспечивать устойчивость организма к данному патогену. Такое состояние организма называют иммунологической памятью.

Первоначальная устойчивость к повторной инфекции обусловлена главным образом воздействием специфичных антител на свободный вирус. С момента начала развития инфекции (заражения клеток и размножения в них вируса) важную роль начинают играть иммунные механизмы, направленные на лизис зараженных клеток и тем самым ограничивающие размножение вируса. Окончанию инфекционного процесса содействуют опять же антитела, действующие на свободный вирус.

До сих пор ни для одного патогенного агента нет окончательной ясности относительно вклада разных механизмов иммунитета в устойчивость организма к инфекции. Поэтому эффективность иммунного ответа при использовании того или иного подхода определяется только экспериментально, сначала на лабораторных животных и лишь затем на людях. В настоящее время ясно, что для эффективной иммунопрофилактики необходима стимуляция возможно большего числа иммунных механизмов в правильном соотношении.

Иммунный организм или совершенно устойчив к инфицирующему микроорганизму, или переносит заболевание в легкой форме. Поэтому медицина и ветеринария уделяют большое внимание разработке методов эффективной и безопасной иммунизации людей и домашних животных. Существуют разные типы вакцин, каждый из которых имеет свои определенные достоинства и недостатки.

17.1. ЦЕЛЬНОВИРИОННЫЕ ВАКЦИНЫ

В качестве ***живых вирусных вакцин*** обычно используют аттенуированные (ослабленные) варианты вирусов, которые являются утратившими большинство свойств патогенности мутантами исходных штаммов. В редких случаях удается найти близкородственный слабопатогенный вирус, вакцинация которым обеспечивает иммунную защиту от другого опасного вируса (например, вакцинация вирусом оспы коров против натуральной оспы). Главное преимущество живых вакцин состоит в том, что они активируют все компоненты иммунной системы, вызывая сбалансированный иммунный ответ. Кроме того, такие вакцины относительно дешевы, так как для иммунизации требуется небольшая доза вируса, поскольку он размножается в зараженном организме.

Недостатком живых вакцин является то, что они обычно сохраняют некоторый уровень остаточной патогенности, хотя он может быть и очень низким. Тем не менее у детей и у лиц с дефектами иммунной системы они могут вызывать тяжелые формы заболевания. Одной из проблем при массовом производстве аттенуированных вакцин является их возможная генетическая нестабильность, приводящая к возвращению свойств патогенности. Поэтому партии вакцин необходимо тщательно проверять на лабораторных животных. Кроме того, живые вакцины могут проявлять биологическую нестабильность при хранении и использовании в практической медицине или ветеринарии. Более того, как показывает опыт, живые вакцины в процессе наработки на культурах клеток могут загрязняться другими вирусами, поэтому требуется строгий контроль за качеством получаемых препаратов вакцин. Важно отметить, что далеко не для всякого вируса удается получить аттенуированный штамм, пригодный для использования в качестве живой вакцины. Во многом это является делом случая и зависит от мастерства и интуиции исследователя.

Ряд сложностей, возникающих при получении и применении живых вакцин, удается преодолевать, используя ***инактивированные вакцины***, которые представляют собой препарат патогенного вируса, инактивированного формальдегидом, β-пропиолактоном или каким-либо другим химическим соединением. Инактивация направлена на вирусный геном и по возможности не должна затрагивать белковый каркас вирусной частицы. В данном случае риск заражения при вакцинации практически отсутствует, не требуется проводить сложную, длительную и не всегда успешную работу по получению аттенуированных штаммов. Инактивированные вакцины, как правило, проще сохранять.

Основным недостатком инактивированных вакцин является то, что они уступают аттенуированным живым вирусам в эффективности индукции Т-клеточного иммунитета. Кроме того, для эффективной индукции гуморального иммунитета необходимо вводить относительно большие дозы инактивированной вакцины с определенной периодичностью, что может приводить с течением времени к аллергизации организма. При инактивации вируса часть антигенов может полностью или частично разрушаться, что также снижает качество вакцины. Следует отметить, что при препаративной наработке патогенных вирусов, предназначенных для получения инактивированных вакцин, предъявляются повышенные требования к обеспечению безопасности как самого персонала, так и окружающей среды, т. е. необходимы дорогостоящие специально оборудованные помещения.

17.2. ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ВИРУСНЫХ АНТИГЕНОВ

Как отмечено выше, живые и инактивированные вакцины могут оказывать патогенное или аллергенное воздействие на некоторых вакцинируемых. Поэтому разрабатываются более безопасные варианты противовирусных вакцин. Наиболее продуктивно при этом использование очищенных вирусных белков. Такие вакцины называют ***субъединичными***. Обычно они представляют собой набор протективных вирионных белков или отдельный поверхностный протективный белок, выделенный из препарата вирусных частиц. Под протективной активностью антигена понимается его способность обеспечивать развитие устойчивости иммунизируемого организма к последующему инфицированию данным вирусом. Иммуногенность, или способность вызывать в организме образование антител, зависит от наличия на поверхности молекулы белка ***эпитопов*** — антигенных детерминант, образуемых обычно 6–8 аминокислотными остатками и обладающих наибольшим сродством к связывающей области специфического иммуноглобулина (см. рис. 7.11). Обычно белок имеет несколько разных эпито-

пов, при этом каждый эпитоп узнается определенными лимфоцитами, синтезирующими антитела только против него. Таким образом, против чужеродного белка иммунная система обычно вырабатывает несколько разных типов иммуноглобулинов.

Антигенные детерминанты вирусных частиц могут быть трех типов:

- эпитопы, представленные непрерывными участками полипептидной цепи;
- конформационные эпитопы, представляющие собой пространственно сближенные отдельные участки полипептидной цепи;
- конформационные эпитопы, составленные аминокислотными остатками двух или более белков, объединенных в макроструктуру в составе вирусной частицы.

Наличие конформационных детерминант часто приводит к тому, что иммуногенные свойства вирусных белков определяются их третичной и четвертичной структурой.

В том случае, когда главная (наиболее иммуногенная) антигенная детерминанта протективного вирусного белка представлена непрерывной аминокислотной последовательностью, можно осуществить ее химический синтез и полученным синтетическим пептидом провести иммунизацию. Многочисленные эксперименты, выполненные в данном направлении, показали, что в некоторых случаях ***пептидные вакцины*** обеспечивают специфическую защиту организма от соответствующего вируса.

Хотя метод получения вакцин с использованием синтетических пептидов обладает значительными потенциальными возможностями, имеются и существенные сложности, связанные прежде всего со слабой антигенной активностью большинства индивидуальных пептидов из-за их малого размера. Усиления иммуногенности таких пептидов часто удается добиться после связывания их с высокомолекулярными носителями (например бычьим сывороточным альбумином). Однако получение таких вакцин весьма трудоемко и дорого.

Разработка методов генетической инженерии позволила поставить вопрос о возможности получения высокоиммуногенных ***молекулярных вакцин*** против различных патогенных микроорганизмов, т. е. субъединичных или пептидных вакцин, синтезируемых в прокариотических или эукариотических клетках за счет экспрессии введенных в них чужеродных генов. Методы генетической инженерии обеспечивают принципиальную возможность наработки в больших количествах индивидуальных вирусных белков, а также гибридных антигенов, способных индуцировать в организме животных антитела против двух или более патогенов.

Для некоторых вирусов не удается подобрать условия их размножения на культурах клеток или в организме лабораторных животных и поэтому невозможно получить даже инактивированную вакцину. Ярким примером является вирус гепатита В, для которого не найдено культур клеток млекопитающих, обеспечивающих его наработку. Кроме человека к нему чувствительны только обезьяны шимпанзе. Поэтому данный вирус одним из первых привлек внимание исследователей. Встал вопрос, можно ли методами генетической инженерии создать молекулярную вакцину против заболевания гепатитом В. Многие лаборатории взялись за решение этой проблемы, что позволило в итоге добиться положительного результата.

Жесткая фиксация и многократное повторение антигенных детерминант на поверхности вирусных частиц обеспечивают их высокую иммуногенность. Синтезируемые же генно-инженерным способом индивидуальные протективные вирусные белки, как правило, не формируют макроструктур и, в частности, поэтому обладают гораздо меньшими иммуногенными свойствами по сравнению с тем же белком, но входящим в состав вирусного капсида. Одним из первых доказательств этого положения являются результаты, полученные для вируса гепатита В человека.

В крови больных гепатитом В кроме вирусных частиц находятся небольшие сферические частицы со средним диаметром 22 нм (рис. 7 на цв. вклейке). Эти частицы состоят из молекул поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) и обладают высокими антигенными и протективными свойствами. В 1982 г. было обнаружено, что при эффективной экспрессии искусственного гена HBsAg в клетках дрожжей происходит самосборка из вирусного белка изометрических частиц (см. подробнее 12.5.3). Частицы HBsAg, полученные методом генетической инженерии, по структуре и иммуногенным свойствам практически не отличаются от природных. Мономерная же форма HBsAg обладает значительно меньшей иммуногенной активностью.

В 1984 г. в эксперименте на добровольцах было продемонстрировано, что полученная генно-инженерная вакцина против гепатита В вызывает в организме человека эффективное образование вируснейтрализующих антител. Данная дрожжевая молекулярная вакцина явилась первой генно-инженерной вакциной, которая

Таблица 17.1. **Сравнительная иммуногенность препаратов, содержащих протективную антигенную детерминанту вируса ящура**

Препарат	Доза, мкг		Титр вируснейтрализующих антител, lg		
	суммарного антигена[1]	последовательности VP1 вируса ящура 142–160 АК[2]	Время после инокуляции, дней		
			0	28	42
Частицы инактивированного вируса ящура	1	0,02	< 0,6	1,6	1,7
Химерный белок HBcAg/142–160 АК	2	0,2	< 0,6	2,1	2,9
Химерный белок β-Gal/(137–162 АК)$_2$	200	7	< 0,6	1,5	1,9
Пептид 142–160 АК	100	100	< 0,6	1,8	1,7
Пептид 137–160 АК	120	100	< 0,6	2,7	2,2

[1] Минимальная доза, приводящая к выработке антител, способных нейтрализовать вирус при разведении сыворотки крови иммунизированных животных в 100 раз.

[2] Доза, рассчитанная исходя из содержания данной последовательности в суммарном антигене.

была разрешена для использования в медицине. До сих пор она обеспечивает единственный надежный способ массовой защиты от гепатита В.

В связи с низкой иммуногенностью индивидуальных вирусных белков возникла идея создания надмолекулярных вирусоподобных белковых структур, в которых многократно представлены те или иные антигенные детерминанты. При этом необходимо наличие белка-носителя, который при определенных условиях способен осуществлять самосборку вирусоподобных частиц. При встройке в заранее выбранный район гена белка-носителя кодирующей последовательности антигенной детерминанты изучаемого вируса можно надеяться на то, что детерминируемый таким гибридным геном химерный белок будет способен по-прежнему формировать надмолекулярные структуры и экспонировать на их поверхности чужеродные антигенные детерминанты.

Первый успех, имеющий практическое значение, достигнут Б. Кларком с соавторами (1987 г.). В качестве белка-носителя был использован коровый белок вируса гепатита В человека (HBcAg). При нормальном развитии вируса гепатита В около 200 молекул HBcAg формируют изометрическую частицу диаметром 27 нм, содержащую вирусный геном. Клонирование гена, кодирующего HBcAg, и экспрессия его в гетерологичной системе, включая *E. coli*, показали, что данный белок способен осуществлять самосборку и формировать без каких-либо дополнительных компонентов вируса частицы, не отличимые по иммунологическим и морфологическим признакам от частиц, формируемых природным HBcAg.

Б. Кларк с соавторами сконструировали гибридный ген, в котором к последовательности, кодирующей HBcAg, подстроили в правильной рамке трансляции ген-эквивалент протективной антигенной детерминанты вируса ящура, представляющей собой последовательность 142–160 АК вирусного белка VP1. Детерминируемый гибридным геном химерный белок оказался токсичным для *E. coli*, поэтому он был синтезирован в культуре клеток животных CV-1. Химерный белок формировал вирусоподобные частицы, которые после очистки от других белков проверяли на иммуногенность. Показано, что по иммуногенным свойствам полученные надмолекулярные структуры, в которых многократно представлены встроенные эпитопы, приближаются к частицам вируса ящура (табл. 17.1). В то же время химерный белок β-галактозидаза — протективный эпитоп белка VP1 вируса ящура β-Gal/(137–162 АК)$_2$, а тем более синтетические пептиды обладали значительно меньшей иммуногенной активностью по сравнению с частицами, формируемыми химерой HBcAg/142–160 АК.

Данная работа показывает перспективность создания вирусоподобных комплексов, способных экспонировать на своей поверхности чужеродные антигенные детерминанты, для получения безопасных молекулярных противовирусных вакцин. Тем не менее важнейшим направлением научных изысканий остается разработка и совершенствование новых типов живых вакцин, поскольку они индуцируют сбалансированный гуморальный и клеточный иммунный ответ.

17.3. ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫЕ ПОЛИВАЛЕНТНЫЕ ЖИВЫЕ ВАКЦИНЫ

С появлением в середине 1970-х гг. методов генетической инженерии стала реальной возможность встраивать в вирусные геномы чужеродные гены, направляющие синтез желаемых белков. В 1980 г. проведены первые эксперименты на вирусе простого герпеса человека, в 1981 г. — на аденовирусе человека, в 1982 г. — на вирусе осповакцины. Возникла идея создания гибридных вирусов, способных при заражении человека или животных синтезировать не только свои белки, но и протективные белки других патогенных вирусов, для которых нет эффективных вакцин. Такие гибридные вирусы получили название ***живые поливалентные вакцины***. Как уже отмечалось, важное значение для защиты от вирусной инфекции имеет Т-клеточный иммунный ответ. Цитотоксические Т-лимфоциты продуцируются только в ответ на антиген, синтезируемый эндогенно в клетках организма, и не продуцируются при введении этого же антигена извне, т. е. в составе убитой вакцины или в виде индивидуального белка. Поэтому разработка живых поливалентных противовирусных вакцин открывает новые, ранее не доступные возможности иммунопрофилактики различных инфекционных заболеваний.

Несомненно, что при создании живых поливалентных вакцин в качестве векторов наиболее целесообразно использовать вирусы, уже применяемые как живые вакцины. При этом, как показали опыты, генно-инженерные манипуляции без особых проблем можно осуществлять лишь на крупных ДНК-содержащих вирусах, так как размер их генома не имеет строгих ограничений при упаковке в вирион и поэтому допустима встройка в такую вирусную ДНК от одного до нескольких чужеродных генов.

Одной из самых эффективных и безопасных живых вакцин является вакцина против полиомиелита — заболевания человека, вызываемого полиовирусом. Различают три серотипа полиовирусов: типы 1, 2 и 3. Полиовирусы относятся к семейству Picornaviridae. Икосаэдрические капсиды содержат по 60 молекул каждого из четырех структурных белков: VP1–VP4. В капсиды заключена одноцепочечная молекула позитивной РНК (т. е. вирусная геномная РНК одновременно является матричной, вследствие чего она инфекционна в тесте трансфекции). Размер полиовирусной РНК составляет около 7500 нуклеотидов. С помощью обратной транскриптазы получены полные ДНК-копии генома разных штаммов полиовируса, встроены под прокариотические промоторы таких фагов, как Т7 или SP6, и с помощью РНК-полимеразы соответствующего фага *in vitro* транскрибированы в молекулы РНК. Полученные таким образом молекулы РНК после трансфекции пермиссивных клеток формируют полноценное вирусное потомство. Возможность перевода РНК-генома вируса в ДНК-форму, а затем обратно в инфекционную РНК позволяет осуществлять различные генно-инженерные манипуляции с вирусным геномом в форме ДНК и исследовать их влияние на свойства вируса после трансфекции культивируемых клеток животных измененной молекулой РНК.

Детальные исследования позволили локализовать на поверхности полиовирусных частиц четыре типа независимых антигенных детерминант, которые индуцируют в организме продукцию вируснейтрализующих антител. Антигенная детерминанта 1 (АД1) — непрерывный эпитоп, представляющий собой последовательность 91–102 АК белка VP1. Эпитопы 2, 3 и 4 принадлежат к конформационным и составлены из аминокислотных остатков более чем одного капсидного белка.

В ряде лабораторий независимо выполнены работы по созданию на основе полноразмерной ДНК-копии вирусного генома гибридных вариантов полиовируса, и прежде всего таких, которые могли бы стать новыми формами живых вакцин. Рассмотрим наиболее показательные эксперименты К. Барка с соавторами (1988–1989 гг.), которые на основе полной ДНК-копии генома аттенуированного штамма Сэбин полиовируса типа 1 создали гибридный полиовирус путем замены антигенной детерминанты 1 на соответствующую последовательность АД1 полиовируса типа 3. Полученный гибридный вирус индуцировал иммунный ответ одновременно против полиовирусов типа 1 и типа 3 в организме мышей, кроликов, приматов и может рассматриваться как принципиально новая живая вакцина.

В целях расширения возможностей создания нового поколения живых вакцин К. Барк с соавторами сконструировали плазмиду pCAS1, названную кассетным вектором. В составе плазмиды pCAS1, содержащей полную ДНК-копию генома полиовируса под контролем промотора фага Т7, олигонуклеотид-направленным мутагенезом в область, кодирующую АД1, введены участки гидролиза рестриктазами *Sal*I и *Dra*I (рис. 17.1). Сегмент ДНК, ог-

```
        91                                               (F)           105
        T    V    D    N    S    A    S    T    K    N    K    D    K    L    F
        ACC  GTG  GAT  AAC  TCA  GCT  TCC  ACC  AAG  AAC  AAG  GAT  AAG  CTA  TTT

pCAS1        GTC  GAC                                        TTT  AAA
               SalI                                            DraI
```

Рис. 17.1. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности антигенной детерминанты 1 полиовируса Сэбин 1 и введение в их состав изменения при создании кассетного вектора pCAS1

Таблица 17.2. **Аминокислотные вставки в кассетный вектор pCAS1**

Вирус	Аминокислотная последовательность[1]	Локализация в белках-донорах
Полиовирус:		
Сэбин 1	NSASTKNKD	VP1 94–102
векторный Cas1	NSASTKNKF	VP1 94–102
Сэбин 3	NEQPTTRAQ	VP1 92–100
Вирус гепатита A	(N)EQNPVD(D)	VP1 15–20
	KDLKGKANRGKMD	VP1 29–41
	ELKPGESRHTSD	VP1 70–81
	TFNSNNKEY	VP1 109–117
	NSNNKEYT(D)	VP1 111–118
	(N)ATDVDG(KD)	VP1 150–155
	NTRRTGN(KD)	VP1 191–197
	(N)GLGDKTDS	VP1 217–224
	DPRSEEDKRFE	VP1 290–300
Риновирус 2	KLEVTLANY	VP1 81–89
Риновирус 14	KDATGIDNHREA	VP1 85–96
	(N)MYVPPGAPNP(D)	VP1 151–160
	(N)KLILAYTPPGARGPQD	VP3 126–141
Вирус Коксаки B4	(N)SAESNNL(D)	VP1 81–87
	IYIKYSSAESNNL[2]	VP1 75–87

[1] Аминокислотные остатки в скобках сохранены от последовательности Сэбин 1 дикого типа.
[2] Вариант с данной вставкой не формировал жизнеспособного вируса.

раниченный уникальными участками *Sal*I и *Dra*I, в кассетном векторе замещали синтетическими фрагментами, соответствующими различным участкам генома других РНК-содержащих вирусов (табл. 17.2). Оказалось, что данный район белка VP1 полиовируса допускает широкие вариации в последовательности аминокислот и длине вставки, не влияющие заметно на жизнеспособность вируса. Принимая во внимание, что этот участок VP1 экспонирован на поверхности вирусной частицы, можно рассчитывать на создание эффективных живых вакцин, обеспечивающих одновременно защиту не только от полиовируса, но и от других вирусов, например гепатита A.

Как видим, методы генетической инженерии создают реальные перспективы конструирования принципиально новых искусственных иммуногенов, имеющих большое значение для медицины и ветеринарии.

17.4. ДНК-ВАКЦИНЫ

При создании живых поливалентных вирусных вакцин одной из основных проблем является преодоление возможных побочных эффектов вакцинации. Во-первых, необходимо свести к минимуму реактогенность полученного гибридного вируса. Во-вторых, при вакцинации гибридным вирусом формируется полноценный иммунный ответ не только на целевой антиген, но и на все антигены векторного вируса. Поэтому повторное использование того же вектора, но для вакцинации против другого заболевания может быть затруднено.

Преодолеть эти препятствия, возможно, удастся с использованием новейшего подхода

к иммунопрофилактике вирусных инфекций, который предложили Д. Танг с соавторами в 1992 г. Одновременно несколько групп ученых опубликовали в 1993 г. результаты своих работ, подтвердивших перспективность нового направления исследований — создания ДНК-вакцин. Оказалось, что в организм животного можно просто вводить препарат гибридной плазмиды, содержащей ген протективного вирусного антигена, находящийся под контролем эукариотических сигналов инициации и терминации транскрипции. Происходящий в клетках синтез вирусного антигена приводит к формированию гуморального и клеточного иммунного ответа против целевого вируса, так как происходит в некоторой степени имитация вирусной инфекции (внутриклеточный синтез вирусного белка). Большим преимуществом ДНК-вакцин является то, что они индуцируют развитие полноценного иммунного ответа, характерного для живых вакцин, но при этом не используется живой вирус, который может с определенной частотой вызывать побочные эффекты. Поэтому ДНК-вакцины существенно безопаснее живых противовирусных вакцин.

С помощью методов генетической инженерии в плазмиду можно встроить необходимый ген (или несколько генов), который затем будет экспрессироваться в клетках млекопитающих, в том числе и человека. Показано, что при разных способах введения (внутрикожном, внутримышечном, внутривенном и др.) гибридная плазмида может проникать в клетки, достаточно долго сохраняться в организме и направлять синтез вирусного белка. На лабораторных животных (мышах, цыплятах, приматах) доказано, что вакцинация препаратами гибридных плазмид обеспечивает иммунную защиту от вирусов гриппа, гепатита В, гепатита С и др.

Для повышения эффективности ДНК-вакцин можно дополнительно вводить плазмиду, экспрессирующую цитокины, необходимые для активации Т-клеточного иммунного ответа.

Появляются данные о том, что тип иммунного ответа, вызванного экспрессируемым ДНК-вакциной иммуногеном, может существенно зависеть от того, является ли синтезируемый белок внутриклеточным, или он секретируется из клетки в окружающую среду, или секретируется на поверхность клетки. Совсем неожиданно японские исследователи обнаружили короткие иммуностимулирующие последовательности ДНК (ISS), введение которых в состав гибридных плазмид приводит к усилению Т-клеточного иммунного ответа.

ДНК-вакцины производить очень просто, дешево и безопасно, так как этот процесс включает в себя лишь культивирование непатогенных бактерий (обычно лабораторных штаммов *E. coli*), содержащих гибридную плазмиду, с последующим разрушением клеток и выделением плазмидной ДНК. Плазмиды более стабильны при хранении, чем большинство вакцин другого типа.

Относительная простота (по сравнению с классическими методами аттенуации инфекционных агентов) создания ДНК-вакцин позволяет в обозримые промежутки времени проверить на модельных животных множество вариантов кандидатных вакцин против определенной инфекции, что значительно повышает вероятность положительного исхода проводимых исследований.

Поскольку ДНК-вакцины направляют синтез в организме, как правило, лишь одного-двух целевых белков, они менее аллергенны, чем цельновирионные вакцины.

Потребуется еще некоторое время, прежде чем можно будет определенно сказать, применима ли ДНК-вакцинация для человека. Во всяком случае, уже сейчас ясно, что в последние десять лет генетическая инженерия внесла огромный вклад в развитие новых подходов к иммунопрофилактике инфекционных заболеваний. Можно с оптимизмом заключить, что последующие исследования позволят получать все более надежные и безопасные варианты противовирусных вакцин.

17.5. ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА

17.5.1. Пандемия СПИДа

В результате объединения усилий мирового сообщества под эгидой Всемирной организации здравоохранения в период с 1958 по 1977 г. удалось ликвидировать одно из наиболее опасных инфекционных заболеваний человека — оспу. Ареал распространения ряда других инфекций также удалось существенно сузить. Это привело многих к уверенности, что инфекционные заболевания больше не представляют серьезной опасности для цивилизованного мира. Однако вскоре на человечество совершенно неожиданно обрушилась эпидемия нового грозного заболевания — синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИДа).

Первые случаи СПИДа были зарегистрированы у гомосексуалистов в США в 1981 г. специалистами Центра по контролю над заболевае-

мостью (Атланта, штат Джорджия). СПИД является болезнью иммунной системы, которая сопровождается развитием у больных глубокой иммунной недостаточности, проявляющейся в том, что безопасные для здорового человека микроорганизмы приобретают способность вызывать тяжелые инфекционные заболевания (так называемые оппортунистические инфекции). Кроме того, для СПИДа характерно развитие у молодых людей ряда онкологических заболеваний, которые обычно встречаются только в пожилом возрасте.

Причина и пути передачи СПИДа поначалу были не ясны. Однако уже в 1983 г. усилиями двух лабораторий, руководимых Р. Галло (США) и Л. Монтанье (Франция), удалось обнаружить возбудитель СПИДа. Им оказался ретровирус, получивший название вирус иммунодефицита человека (HIV, ВИЧ). Стало ясно, что HIV-инфекция служит причиной прогрессирующего нарушения функций иммунной системы человека, а СПИД — лишь одно из проявлений этого процесса, притом самое позднее.

Источником инфекции является человек, больной СПИДом, или бессимптомный вирусоноситель. HIV обнаружен в крови, сперме, грудном молоке, секрете шейки матки, слюне, слезной жидкости, моче. Однако не все эти биологические жидкости могут переносить инфекцию, так как концентрация вируса в них существенно различается. Огромный массив исследований показал, что реально инфекционными являются лишь кровь, сперма, секрет шейки матки и грудное молоко. Инфекция HIV не передается от больного к здоровому при обычном общении. До сих пор не выявлено ни одного случая передачи HIV через укусы кровососущих насекомых. Обычным путем распространения вируса являются половые контакты (вероятность заражения 10–70 %). Другой путь передачи вируса — через зараженную донорскую кровь или ее компоненты (вероятность заражения близка к 100 %), донорские органы и сперму. Возможно заражение в результате медицинских манипуляций, выполняемых без соблюдения правил обработки инструментария. Чрезвычайно быстро ВИЧ распространяется между наркоманами, использующими общие иглы и шприцы для внутривенного введения наркотиков. От инфицированной матери к ребенку вирус передается до или во время родов с вероятностью 25–50 %, а также при кормлении грудью.

Точное время и место начала развития эпидемии СПИДа не известно. Однако полагают, что HIV на протяжении многих лет существовал в небольших изолированных поселениях где-нибудь в Центральной Африке (антитела к HIV были обнаружены в донорской крови, полученной в Заире еще в 1959 г.). Но с изменением условий жизни в Центральной Африке и миграцией населения из отдаленных районов в большие города вирус приобрел возможность широкого распространения первоначально в Африке, а затем и на других континентах. Коварство данного заболевания состоит в том, что инфицированный человек в течение нескольких лет чувствует себя нормально, но при этом может заражать окружающих людей через половые контакты или кровь. Именно поэтому эпидемия СПИДа была обнаружена лишь когда она достигла внушительных размеров. В настоящее время распространение HIV-инфекции приобрело характер пандемии (о пандемии говорят, когда эпидемия какого-либо заболевания людей охватывает целую страну, континент или еще более обширные территории).

Для слежения за пандемией создана Глобальная программа по СПИДу под эгидой ВОЗ. К концу 1996 г. в мире было выявлено более 8,4 млн случаев СПИДа, из них 74 % приходилось на Африку, 8 % — на Северную Америку, 7 % — Латинскую Америку, 6 % — Азию, 4 % — Европу и 1 % — Австралию и Новую Зеландию. Число инфицированных на этот момент превысило 24 млн человек, из них 16 млн выявлено в Африке и лишь 29 тыс. — в Восточной Европе и Центральной Азии.

По данным ВОЗ, на конец 2001 г. число людей, умерших от СПИДа за 20 лет наблюдения, составило 22 млн, а живущих с этой инфекцией — превысило 40 млн. При этом только в 2001 г. от СПИДа умерли 3 млн человек. Ежедневно в мире заражаются HIV примерно 16 тыс. человек. Более половины всех инфицированных — люди, не достигшие 25 лет.

Пандемия СПИДа в настоящее время охватила все континенты. Различия состоят лишь в массовости инфицирования и отражают в первую очередь время начала распространения HIV в каждом географическом регионе (рис. 8 на цв. вклейке).

В России HIV-инфекция впервые была обнаружена в 1986 г. Это была ранняя фаза проникновения вируса, пропущенная для изучения и профилактики во многих других странах. В срочном порядке были разработаны отечественные тест-системы и налажено их производство. По всей стране было создано около 80 специализированных центров СПИДа и несколько сотен диагностических лабораторий. Принят

федеральный закон о предотвращении распространения данной инфекции в России. Своевременно принятые меры замедлили развитие эпидемии СПИДа в России по сравнению со многими другими странами.

В 1987–1988 гг. на территории России был выявлен 71 зараженный HIV гражданин России и более 300 иностранцев. Оказалось, что HIV проникал в Россию в основном из развитых стран в среду гомосексуалистов, а гетеросексуальным путем — из Африки. Данная тенденция сохранялась до 1995 г., но с 1996 г. вялотекущая эпидемия СПИДа в России перешла в новую стадию — взрывообразное увеличение числа инфицированных. К этому времени в России (и несколько ранее в соседних Украине и Белоруссии) произошло радикальное изменение путей распространения HIV. Если ранее вирус в основном распространялся половым путем, то уже в 1994–1995 гг. были выявлены первые инфицированные HIV наркоманы. За считанные месяцы внутривенное введение наркотиков из фактора риска, который несколько лет себя не проявлял, превратилось в основной путь передачи HIV в России.

Большая опасность новой фазы эпидемии СПИДа в России состоит в том, что зараженные наркоманы могут разносить HIV и при половых контактах. Это может в ближайшем будущем привести к взрывообразному увеличению числа HIV-инфицированных в разных группах населения. Так, доля зараженных при половых контактах в России выросла с 17 % в 2001 г. до 40 % в 2002 г. К середине 2003 г. число выявленных HIV-инфицированных в России превысило 240 тыс. человек. Подавляющее большинство инфицированных относятся к возрастной группе от 15 до 40 лет, что соответствует общемировой тенденции.

Эпидемия СПИДа в России из разряда медицинской проблемы переходит в разряд общенациональной социальной проблемы, и к ее решению необходимо привлекать специалистов разных областей.

17.5.2. Тестирование HIV-инфекции

Большинство вирусных инфекций развиваются быстро, и врач идентифицирует их прежде всего по клиническим проявлениям у больного. Для HIV-инфекции такой подход неприменим, так как ее внешние признаки могут появиться лишь спустя месяцы и годы после заражения. Поэтому всеобщее распространение получил метод обнаружения в крови человека антител к вирионным белкам HIV. Первые варианты такого метода были разработаны уже в 1984 г. и использовали принцип иммуноферментного анализа (ИФА).

Метод основан на том, что в ответ на любую вирусную инфекцию в организме вырабатываются антитела, которые способны высокоспецифично связываться как с цельными вирусными частицами, так и с их отдельными белками — антигенами. Вирусные антигены обычно химически соединяют с ферментом, способным катализировать цветную реакцию. Комплекс антитело – антиген – фермент определенным образом фиксируют в ячейках прозрачных пластиковых планшет и затем проводят цветную реакцию, характерную для конъюгированного с антигеном фермента. Если реакция прошла, значит, в изучаемом образце крови имеются антитела к HIV. В качестве антигена в таких тест-системах можно использовать либо наработанный на культуре клеток и очищенный HIV, либо его отдельные белки (или их смесь), синтезированные методами генетической инженерии в клетках бактерий и дрожжей.

Метод ИФА используется для массовых обследований. В случае положительного результата обязательно выполняются дополнительные исследования другими методами, обеспечивающие достоверность результатов. Однако данная схема обследования на инфицированность HIV позволяет выявлять не всех реально зараженных, так как инфекция вначале обычно протекает бессимптомно и антитела к вирусу в крови появляются лишь спустя 3–6 мес. после заражения. Именно поэтому донорскую кровь важно проверять не только стандартным методом ИФА, но и более чувствительным методом ПЦР для выявления ДНК провируса в клетках крови. Конечно, это существенно удорожает процедуру тестирования донорской крови, но зато практически полностью исключает возможность заражения HIV при переливании крови или ее компонентов.

17.5.3. Стадии развития HIV-инфекции

Для вируса иммунодефицита человека характерны все особенности жизненного цикла ретровирусов (см. 14.6.1). Отличительным свойством HIV является то, что он адсорбируется только на тех клетках, которые содержат на поверхности антиген CD4. В основном это T4-лимфоциты, играющие важнейшую роль в координации работы всей иммунной системы. Уничтожение вирусом лимфоцитов этого типа и обусловливает его иммуносупрессорное действие.

Разработка методов тестирования и многолетние наблюдения за HIV-инфицированными пациентами позволили подробно изучить течение данной инфекции. Согласно принятой классификации заболевание в своем развитии проходит шесть стадий (рис. 10 на цв. вклейке).

Первая стадия протекает, как правило, бессимптомно и длится 6–12 мес. после заражения. В это время происходит размножение вируса, которое затем затухает. Содержание Т4-лимфоцитов в крови при этом обычно близко к норме — около 800 клеток в 1 мл.

Вторая, самая протяженная стадия занимает обычно 3–5 лет и характеризуется развитием хронической лимфоаденопатии (увеличением лимфатических узлов) и постепенным снижением содержания Т4-лимфоцитов в крови. Самочувствие больного на этой стадии все еще хорошее.

Снижение количества Т4-лимфоцитов до 400 клеток в 1 мл и менее знаменует наступление третьей стадии, которая характеризуется скрытым (субклиническим) нарушением иммунной системы.

Четвертая стадия по внешним проявлениям не отличается от предыдущей, но для нее характерны более глубокие изменения в иммунной системе, которые обнаруживают лишь дополнительными анализами.

На пятой стадии иммунная система больного угнетается настолько, что возникают клинические проявления в виде молочницы — поражения слизистой полости рта дрожжеподобными грибами *Candida albicans*, других стойких вирусных и/или грибковых заболеваний кожи и слизистых (например хронической инфекции вирусом простого герпеса). К началу этой стадии концентрация Т4-лимфоцитов в крови обычно становится менее 200 клеток в 1 мл.

Через 1–2 года после начала пятой стадии у больного развиваются хронические оппортунистические инфекции, что свидетельствует о глубоких нарушениях иммунной системы. Часто это тяжелая пневмония, вызываемая простейшими *Pneumocystis carinii* (пневмоцистоз). Такие осложнения свидетельствуют о переходе HIV-инфекции в последнюю, шестую стадию, которая и называется СПИДом. Содержание Т4-лимфоцитов при этом обычно ниже 100 клеток в 1 мл. Данная стадия длится, как правило, не более двух лет и завершается смертью больного.

Как уже указывалось, на первой стадии инфекции происходит активное размножение вируса, однако по мере развития иммунного ответа к началу второй стадии его содержание в крови существенно снижается (рис. 11 на цв. вклейке). Затем в течение длительного времени идет борьба вируса с иммунной системой, которая приводит к постепенному истощению пула Т4-лимфоцитов и возрастанию концентрации вируса в крови. Со временем Т4-лимфоцитов становится так мало, что иммунная система практически не действует. Это приводит к тому, что HIV беспрепятственно размножается и оставшиеся Т4-лимфоциты быстро гибнут.

Следует отметить, что в настоящее время медицина не располагает средствами, которые позволили бы вылечить HIV-инфицированного человека. Однако разработаны схемы лечения, задерживающего на некоторое время развитие заболевания. Поскольку HIV-инфекция, как правило, протекает длительно, особенно при лечении, можно надеяться, что за это время ученые смогут разработать новые подходы к лечению.

17.5.4. Варианты вакцин против вируса иммунодефицита человека

Многолетний опыт показывает, что с вирусными инфекциями удается успешно бороться лишь при наличии эффективной, дешевой, безопасной и простой в применении вакцины. Разработка любой вакцины требует хорошего знания свойств инфекционного агента и закономерностей развития иммунного ответа организма на инфекцию данным микроорганизмом.

Последние 20 лет беспрецедентно большие усилия ученых многих стран направлены на изучение вируса иммунодефицита человека и разработку вакцины против него, но пока об успешном решении данной проблемы говорить не приходится. Это обусловлено тем, что HIV является уникальным типом вируса, с каким до сих пор медицинская наука не сталкивалась.

Для объединения усилий мирового сообщества в борьбе против этой грозной инфекции в 1996 г. была создана организация, названная Международной инициативой по вакцине против СПИДа (International AIDS Vaccine Initiative, IAVI).

В 1997 г. в США объявлена национальная десятилетняя программа по созданию вакцины против СПИДа. В системе национальных институтов здоровья США организован Центр по разработке вакцины против СПИДа. С 1997 г. и в России в рамках межведомственной научно-технической программы «Вакцины нового поколения и медицинские диагностические системы будущего» проводятся активные исследования по направлению «Иммуногены и вакцины анти-

СПИД». Даже эти примеры из длинного списка инициатив разных стран говорят о том, какое большое внимание уделяется разработке вакцины против HIV, которая призвана остановить катастрофическое для человечества распространение пандемии данного инфекционного заболевания.

Вирус иммунодефицита человека обладает рядом свойств, обеспечивающих ему эффективное избегание атаки иммунной системы зараженного организма человека.

1. HIV инфицирует клетки, имеющие на своей поверхности CD4-антиген. К таким клеткам относятся Т4-лимфоциты, называемые Т-хелперами (помощниками), и макрофаги. Т4-лимфоциты обычно находятся в состоянии покоя, но после появления в организме патогена они активируются и запускают развитие как клеточного (через цитотоксические Т8-лимфоциты), так и гуморального иммунного ответа, т. е. играют ключевую роль в регуляции иммунитета. Макрофаги также индуцируют Т-клеточный иммунный ответ. Инфицирование HIV данных типов клеток и их разрушение нарушает регуляцию иммунных механизмов. Клетки, которые должны запускать защитные реакции организма, сами являются мишенями данного патогена. Необходимо научиться уничтожать только те клетки, которые заражены вирусом, так как неселективное уничтожение Т4-лимфоцитов и макрофагов приведет не к излечиванию зараженного человека, а к уничтожению его иммунной системы и быстрой гибели.

2. Репликация генома HIV характеризуется очень высокой частотой ошибок, что приводит к постоянному возникновению мутантных форм вируса с измененной антигенной структурой. Такой антигенный дрейф наблюдается, например, у вируса гриппа, что препятствует разработке эффективной вакцины против него. У HIV скорость накопления мутаций в 65 раз выше. На первой стадии инфекции происходит активное размножение вируса, сопровождающееся интенсивным гуморальным и Т-клеточным иммунным ответом. В результате такой специфичной противовирусной атаки происходит отбор вариантов HIV, которые не узнаются наработанными антителами и цитотоксическими лимфоцитами. Таким образом, в организме человека на поздних стадиях инфекции вирус существенно отличается по антигенной структуре от вируса, вызвавшего заражение.

Изучение изолятов HIV показало, что кроме индивидуальной вариабельности для данного вируса характерно наличие множества субтипов, различающихся генетически и серотипически (рис. 9 на цв. вклейке). В Европе и в Америке чаще всего встречается субтип В. В Африке кроме наиболее распространенного на земном шаре вида HIV-1 обнаружен другой вид — HIV-2, имеющий значительные отличия от HIV-1. Такое разнообразие вариантов вируса вносит дополнительные сложности в разработку эффективной вакцины для массового применения.

3. HIV способен существовать как провирус, т. е. его геном встраивается в хромосомную ДНК клеток. В этой форме вирус может находиться долгое время, и он защищен от воздействия иммунной системы. Поэтому важно разработать такую вакцину, которая препятствовала бы заражению вирусом чувствительных клеток.

4. Большой проблемой при создании вакцины против HIV является отсутствие подходящей модели СПИДа на лабораторных животных.

Кроме человека HIV-1 может заражать только шимпанзе, однако у них не наблюдается симптомов иммунносупрессии. Поэтому потенциальные вакцины против HIV могут проверяться на шимпанзе лишь по подавлению репликации вируса. Другим недостатком данной лабораторной модели является дороговизна, малая численность и сложность получения потомства этих приматов.

Макаки резусы не заражаются HIV-1, но они высокочувствительны к вирусу иммунодефицита обезьян (SIV). Инфекция резусов данным вирусом приводит к развитию у них СПИД-подобного заболевания, завершающегося гибелью животных. SIV имеет ряд принципиальных отличий от HIV по генетической организации, тем не менее он является ближайшим родственником человеческого вируса. Макаки резусы многочисленны в природе и легко размножаются в неволе. Поэтому пара SIV – макак резус очень полезна как лабораторная модель в выработке стратегии создания потенциальной вакцины против СПИДа.

5. В настоящее время нет четких критериев оценки эффективности вакцин против HIV. Неизвестно, какой уровень антител и/или цитотоксических лимфоцитов необходим для эффективного предотвращения HIV-инфекции у человека. Клинические испытания потенциальных вакцин проходят три фазы. Сначала на ограниченном круге добровольцев оценивается безопасность потенциальной вакцины, затем определяется ее иммуногенность и наконец на расширенном круге добровольцев оценивается протективная эффективность.

В каком случае можно считать иммунизацию успешной? Этические нормы требуют, чтобы добровольцы, на которых испытывается экспериментальная вакцина, были предупреждены о необходимости избегать поведения, ведущего к заражению HIV, и поэтому низкая заболеваемость СПИДом у этих людей может отражать не действие изучаемой вакцины, а переход к безопасному сексу. Учитывая длительный латентный период HIV-инфекции, не ясно, сколько времени (2–5 лет?) следует наблюдать за вакцинированными и контрольной группой неиммунизированных добровольцев, чтобы убедиться в эффективности вакцины.

Несмотря на перечисленные сложности в разработке и оценке эффективности вакцины против HIV, последние 10–15 лет проводятся интенсивные исследования в данном направлении. Есть надежда, что накопление как положительных, так и отрицательных результатов в конечном итоге позволит предложить оптимальные схемы вакцинации.

Рассмотрим разные типы вакцин, разрабатываемых против вируса иммунодефицита человека.

Субъединичная вакцина. Первые разработки вакцины против HIV, начатые вскоре после открытия данного вируса, были направлены на получение методами генетической инженерии основного иммуногенного белка оболочки HIV-1, называемого gp120. В экспериментах на шимпанзе для некоторых особей был показан защитный эффект экспериментальной вакцины от заражения HIV. Уже в 1987 г. (рекордно короткий срок!) 140 здоровым добровольцам был введен препарат такого белка. Полученная субъединичная вакцина индуцировала активный гуморальный иммунный ответ, но Т-клеточный ответ был слабым, что характерно для вакцин данного типа. Антитела, выделенные из крови добровольцев, ингибировали репликацию вируса в культуре клеток, но ингибирование было штаммоспецифичным. Ген gp120 был взят от HIV-1 субтипа B, и полученная субъединичная вакцина индуцировала биосинтез в организме человека вируснейтрализующих антител только против данного субтипа. Расширенные испытания вакцины на основе gp120 проводятся на добровольцах в Таиланде. Одновременно создается аналогичный вариант кандидатной вакцины gp120 для субтипа E HIV-1, наиболее часто встречающегося в Таиланде. Планируется использовать для иммунизации смесь этих белков.

Другой путь получения потенциальной вакцины состоит в создании так называемых псевдовирионов HIV. В ДНК провируса делетировали последовательность, необходимую для упаковки вирусной РНК в вирион, а также участки провируса, с которых инициируется транскрипция вирусной РНК. Такую провирусную ДНК методами генетической инженерии поместили под контроль регулируемого промотора человеческого гена и ввели в культуру перевиваемых клеток почки африканской зеленой мартышки. Полученная линия клеток продуцировала вирионы, не содержащие вирусной РНК, они выходили из клеток в культуральную среду, из которой их и собирали. Было показано, что псевдовирионы HIV неинфекционны и иммуногенны. Но, как и любая белковая вакцина, псевдовирионы инициируют развитие в основном гуморального иммунного ответа против HIV определенного субтипа.

Многообещающим направлением работ является создание методами генетической инженерии неприродных белков, состоящих из различных Т- и В-клеточных эпитопов основных антигенов HIV. Для этого на основании данных об аминокислотных последовательностях главных антигенных детерминант вирусных белков, обеспечивающих иммунный ответ, составляется нуклеотидная последовательность ген-эквивалента, кодирующего цепочку таких эпитопов. Рассчитанный ген-эквивалент синтезируется химико-ферментативным путем, встраивается в подходящую векторную молекулу и экспрессируется в выбранной системе бактериальных, дрожжевых или животных клеток. Получаемый неприродный рекомбинантный белок может явиться удачной субъединичной вакциной сразу против многих субтипов HIV. Такие работы проводятся в нескольких научных центрах, в том числе и в Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Кольцово, Россия).

Живая аттенуированная вакцина обеспечивает наиболее полноценный иммунитет против патогенного вируса, поэтому в ряде лабораторий проводятся исследования по разработке вакцины данного типа против HIV. Обнадеживающие результаты получены на модели вируса иммунодефицита обезьян. Аттенуации вируса добивались делециями некоторых генов, приводящими к значительному снижению скорости размножения вируса. Введение макакам полученной вакцины не приводило к развитию СПИД-подобного заболевания, но обеспечивало надежную иммунную защиту от последую-

щего инфицирования этих животных высоковирулентным SIV.

По аналогии с SIV был получен делеционный вариант вируса иммунодефицита человека, который реплицировался очень медленно по сравнению с исходным вирусом. Однако при вакцинации этим аттенуированным вариантом HIV двух шимпанзе не удалось зафиксировать последующей их защиты от инфицирования природным HIV (клинических проявлений СПИД-подобного заболевания у шимпанзе не наблюдается). Тем не менее попытки создать аттенуированный вакцинный штамм HIV продолжаются.

Следует отметить, что ряд исследователей возражают против использования аттенуированного HIV в качестве живой вакцины. Аргументы противников данного подхода состоят в том, что живой вирус, хотя и ослабленный, будет способен рекомбинировать с эндогенными ретровирусными нуклеотидными последовательностями человека и в результате интеграции провирусной ДНК в хромосомы клеток может наблюдаться инсерционный (вставочный) мутагенез. Кроме того, нельзя исключить возможность реверсии аттенуированного штамма к вирулентному варианту. Более того, HIV выращивают на культуре раковых клеток, а биопрепараты, получаемые на таких клетках, не разрешены для использования в медицине. Чтобы обойти данное препятствие, предлагают провирусную ДНК будущего аттенуированного штамма HIV встроить в состав бактериальной плазмиды и выращивать такую гибридную ДНК в бактериальных клетках с последующим выделением ее в высокоочищенной форме. Такую гибридную плазмиду можно будет инъецировать человеку. После попадания в клетку провирусная ДНК будет интегрироваться в хромосомы, а затем с нее будут считываться вирусная геномная РНК и вирусные белки, что приведет к образованию инфекционных частиц HIV. Это и обусловит вакцинацию человека аттенуированным вирусом.

Учитывая потенциальную опасность живой аттенуированной вакцины против HIV, пока нельзя сказать, будет ли такая вакцина создана и использована в массовом масштабе для иммунизации людей.

Инактивированная вакцина. Стимулом для исследований, направленных на создание инактивированной цельновирионной вакцины, явились результаты, полученные на модельных системах. Вирус иммунодефицита обезьян был инактивирован обработкой формальдегидом. Полученным препаратом иммунизировали макак, которых затем заражали живым SIV в дозе, значительно превышающей минимальную инфекционную дозу. У всех контрольных неиммунизированных животных развился синдром иммунодефицита, в то время как ни у одной из вакцинированных обезьян признаков заболевания выявлено не было, хотя некоторые из них оказались инфицированными SIV.

Инактивированный HIV-1 был тестирован на шимпанзе и показал защитный эффект против HIV-инфекции. Однако, как и в случае с SIV, инактивированные вакцины обеспечивали защиту лишь по отношению к штаммам вирусов, использованным для получения данных вакцин.

Испытание инактивированной вакцины на группе HIV-инфицированных добровольцев с ранними симптомами СПИДа дало неоднозначные результаты. Предполагали, что такая иммунизация может активировать иммунный ответ против вирусных антигенов. У части пациентов наблюдали повышение уровня Т4-лимфоцитов, в то время как у других содержание Т-хелперов после вакцинации снизилось. В чем причина такой индивидуальной реакции на проведенную вакцинацию, пока не ясно, и требуются дополнительные исследования.

Таким образом, на пути возможного введения в медицинскую практику инактивированной вакцины против HIV еще предстоит провести большой объем исследований как на модельных животных, так и на добровольцах.

Живая рекомбинантная вакцина. В качестве перспективного объекта для создания рекомбинантных вирусов, предназначенных для иммунопрофилактики HIV-инфекции, рассматривается вирус осповакцины.

Отличительными чертами вируса осповакцины являются его высокая иммуногенность, устойчивость к воздействию тепла (т. е. не требуется хранить вирус в условиях замораживания), простота прививания и низкая стоимость производства. Кроме того, в ходе всемирной кампании по искоренению оспы накоплен громадный опыт применения вируса осповакцины для иммунизации населения.

Встройка в ДНК вируса осповакцины генов белков-иммуногенов различных инфекционных агентов позволяет создавать живые рекомбинантные вакцины, в том числе поливалентные, которые сохраняют все преимущества вируса осповакцины. Более того, встройка в геном рекомбинантных вирусов осповакцины генов таких цитокинов, как интерлейкин 2 и интерлей-

кин 12, приводит к дополнительной активации Т-клеточного иммунного ответа, в том числе против синтезируемого вирусом чужеродного антигена.

В США уже проведена первая фаза клинических испытаний рекомбинантного вируса осповакцины, экспрессирующего ген поверхностного белка gp120 HIV-1. При этом у пациентов не выявлено каких-либо серьезных побочных эффектов и показано развитие клеточного и гуморального иммунного ответа против HIV, который усиливался после дополнительной иммунизации белком gp120.

Очевидно, что работы по созданию рекомбинантных поксвирусов необходимо продолжать, используя новые, более эффективные иммуногены против HIV.

В последнее время в качестве вектора активно используют безопасный для человека вирус оспы канареек, который лишь частично жизнеспособен в организме человека, но не дает потомства. Данный вирус обеспечивает развитие полноценного иммунного ответа, прежде всего Т-клеточного, против целевых антигенов, в том числе антигенов HIV. В настоящее время проводятся клинические испытания такого рекомбинантного вируса на добровольцах.

ДНК-вакцины. Накапливающиеся в последние годы данные демонстрируют большую перспективность научного направления по разработке этого типа вакцин (см. 17.4). Возможность выполнения многофакторных экспериментов с ДНК-вакцинами, включающими усилители клеточного иммунного ответа (цитокины, иммуностимулирующие последовательности ДНК), особенно важна для разработки стратегии вакцинопрофилактики HIV-инфекции. В настоящее время варианты ДНК-вакцин против HIV изучаются на моделях шимпанзе и макак резусов и демонстрируют обнадеживающие результаты. Начаты первые испытания на ограниченном круге добровольцев.

В процессе изучения пандемии СПИДа удалось обнаружить, что некоторые люди остаются серонегативными, т. е. у них не вырабатываются антитела против HIV, несмотря на интенсивную экспозицию вируса. Эти индивидуумы имеют строгий Т-клеточный иммунитет против данной инфекции. Полагают, что такой необычный иммунный ответ может развиться при заражении низкой дозой HIV. В экспериментах на макаках было показано, что иммунизация низкой дозой вируса иммунодефицита обезьян вызывает сильный протективный эффект против SIV-инфекции. При этом в основном регистрируется Т-клеточный иммунный ответ. При введении макакам SIV в высокой дозе формировался в основном сильный гуморальный ответ и развивалась вирусная инфекция. Гуморальный и клеточный иммунный ответ взаимосвязаны, и активное развитие одного звена иммунитета автоматически приводит к подавлению другого. Таким образом, многие предыдущие разработки потенциальных вакцин, ориентированные на индукцию сильного гуморального ответа против HIV, скорее всего, окажутся малоэффективными. Вакцина против HIV прежде всего должна активировать специфичный Т-клеточный ответ.

Вполне возможно, что вакцина против HIV будет комбинированной многокомпонентной. В качестве перспективных составляющих такой вакцины предлагаются иммуногены на основе поксвирусного вектора, рекомбинантные белки, ДНК-вакцины и, возможно, инактивированный вирус. Это должна быть поливалентная вакцина, содержащая набор эпитопов различных субтипов HIV. Очень важным направлением исследований является выбор оптимальной схемы иммунизации.

В целом, учитывая необычные свойства HIV и отсутствие адекватной лабораторной модели вызываемого им заболевания, следует признать, что предстоит сложный путь с привлечением новейших достижений современной науки для разработки эффективной и дешевой вакцины против HIV. Последний аспект особенно важен для проведения массовой вакцинации населения развивающихся стран.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Азбука СПИДа / Под ред. М. Адлера. М.: Мир, 1991. 69 с.

Иммунология: В 3 т. / Пер. с англ.; Под ред. У. Пола. М.: Мир, 1987–1988.

Де Крюи П. Охотники за микробами. Борьба за жизнь. Главная редакция изданий для зарубежных стран изд-ва «Наука», 1987.

Маттьюз Т. Дж., Болонези Д. П. Вакцины против СПИДа // В мире науки. 1988. № 12. С. 90–98.

Мэрфи Б., Ченок Р. Противовирусная иммунизация // Вирусология / Под ред. Б. Филдса, Д. Найпа. М.: Мир, 1989. Т. 2. С. 145–189.

Покровский В. В., Савченко И. Г., Ладная Н. Н., Буравцова Е. В. ВИЧ-инфекция // Информ. бюл. 1997. № 9. С. 4–10.

Тихоненко Т. И. Генно-инженерные вакцины — взгляд в будущее // Биотехнология. М.: Наука, 1984. С. 228–233.

Щелкунов С. Н. Противовирусные вакцины — от Дженнера до наших дней // Соросовский образовательный журн. 1998. № 7. С. 43–50.

Щелкунов С. Н. Эпидемия СПИДа // Соросовский образовательный журн. 1999. № 11. С. 22–28.

AIDS and HIV in perspective: A guide to understanding the virus and its consequences / Ed. B. D. Schoub. Cambridge University Press, 1994. 268 p.

Akahata W., Ido E., Shimada T. et al. DNA vaccination of macaques by a full genome HIV-1 plasmid which produces noninfectious virus particles // Virology. 2000. Vol. 275. P. 116–124.

Burke K. L., Evans D. J., Jenkins O. et al. A cassette vector for the construction of antigen chimaeras of poliovirus // J. Gen. Virol. 1989. Vol. 70. P. 2475–2479.

Calarota S., Bratt G., Nordlund S. et al. Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1-infected patients // Lancet. 1998. Vol. 351. P. 1320–1325.

Gurunathan S., Klinman D. M., Seder R. A. DNA vaccines: immunology, application, and optimization // Annu. Rev. Immunol. 2000. Vol. 18. P. 927–974.

Hooper J. W., Custer D. M., Schmaljohn C. S., Schmaljohn A. L. DNA vaccination with vaccinia virus L1R and A33R genes protects mice against a lethal poxvirus challenge // Virology. 2000. Vol. 266. P. 329–339.

Hu S. L., Abrams S., Misher L. et al. Evaluation of protective efficacy of recombinant subunit vaccines against simian immunodeficiency virus infection of macaques // J. Med. Primatol. 1992. Vol. 21. P. 119–125.

Kuby J. Immunology. N. Y.: W. H. Freeman and Co, 1992. P. 478–485.

Le T. P., Coonan K. M., Hedstrom R. C. et al. Safety, tolerability and humoral immune responses after intramuscular administration of a malaria DNA vaccine to healthy adult volunteers // Vaccine. 2000. Vol. 18. P. 1893–1901.

Progress in AIDS vaccine development // IAVI Report. 1996. Vol. 1, № 1. P. 4–5.

Smith H. A., Klinman D. M. The regulation of DNA vaccines // Curr. Opin. Biotechnol. 2001. Vol. 12. P. 299–303.

Tang D. C., DeVit M., Johnston S. A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response // Nature. 1992. Vol. 356. P. 152–154.

The global spread of HIV // IAVI Report. 1996. Vol. 1, № 1. P. 12.

Tighe H., Corr M., Roman M., Raz E. Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint // Immunol. Today. 1998. Vol. 19. P. 89–97.

Wahren B., Brytting M. DNA increases the potency of vaccination against infectious diseases // Curr. Opin. Chem. Biol. 1997. Vol. 1. P. 183–189.

Глава 18
ТРАНСГЕННЫЕ ЖИВОТНЫЕ

Разработка системы генетической трансформации культивируемых клеток млекопитающих позволила подойти к решению такого важного вопроса, как введение чужеродных генов в организм животных и получение линий животных, передающих по наследству приобретенные гены — трансгены. Таких животных принято называть трансгенными животными.

В 1974 г. Р. Джениш и Б. Минтц описали первую схему эксперимента по введению чужеродной ДНК в эмбрионы мыши. ДНК вируса SV40 инъецировали в бластоцисты, которые помещали в матку специально подготовленных самок. Из таких эмбрионов развивались нормальные взрослые мыши, часть которых содержала в своем геноме множественные копии ДНК вируса SV40.

В дальнейшем были предложены более эффективные приемы создания трансгенных животных.

18.1. ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

18.1.1. Клетки тератокарциномы мыши

В 1975 г. Б. Минтц с соавторами продемонстрировали возможность введения чужеродных генов в организм животного, используя клетки тератокарциномы (ТСС) мыши, которые способны размножаться в культуре, а также терять свои неопластические свойства и нормально дифференцироваться после инъекции в эмбрионы мыши, находящиеся на стадии бластоцисты. Ранние эмбрионы, содержащие инъецированные ТСС, способны развиваться во взрослых мышей, соматические и половые клетки которых мозаичны, так как являются смесью ТСС и клеток с генотипом исходного эмбриона.

Разработанный подход получил дальнейшее развитие в 1980 г. при инъекции в бластоцисты клеток тератокарциномы, несущих чужеродную ДНК. Для этого использовали перевиваемую линию клеток тератокарциномы и ее TK^--производные, способные после введения в бластоцисту давать начало как соматическим, так и половым клеткам. На TK^--клетках можно осуществлять генетическую трансформацию, эффективно отбирать клоны трансформантов и инъецировать трансформированные клетки в эмбрионы.

В ряде экспериментов продемонстрирована интеграция в геном стволовых клеток тератокарциномы мышей множественных копий гена тимидинкиназы вируса простого герпеса. Котрансформацией с вирусным селективным геном в клетки тератокарциномы вводили ген β-глобина человека. Чужеродные гены стабильно сохранялись в геноме трансформантов в интегрированном состоянии.

Более перспективна генетическая трансформация ТСС векторами, содержащими селективные маркеры доминантного типа. В этом случае нет необходимости работать на мутантных линиях клеток, которые могут иметь кроме известной мутации и ряд неидентифицированных изменений в геноме. При помощи вектора pSV2-*gpt* (см. 13.3.4) Е. Вагнер и Б. Минтц в 1982 г. продемонстрировали возможность такой трансформации ТСС дикого типа. Отобранные трансформанты стабильно сохраняли чужеродную ДНК в интегрированном состоянии. Таким образом, в стволовые клетки тератокарциномы мыши котрансформацией с селективным маркером можно ввести любой ген. После отбора и тщательного изучения клонов трансформантов некоторые из них можно использовать для инъекции в ранние эмбрионы в целях получения линий мышей с предопределенными генетическими изменениями. Данная система позволяет анализировать *in vivo* регуляцию экспрессии различных генов в процессе эмбрионального развития организма.

18.1.2. Микроинъекция ооцитов

В 1982 г. показано, что чужеродные эукариотические гены, введенные микроинъекцией в ооциты *Xenopus laevis* или культивируемые клетки животных, способны экспрессироваться в гетерологичном окружении. При этом чужеродная ДНК может интегрироваться в геном клетки. Полученные результаты указывали на то, что микроинъекция молекул ДНК в оплодотворенные ооциты животных может оказаться перспективным методом введения чужеродных генов в организм животных.

Метод микроинъекции ДНК в ооциты в настоящее время наиболее популярен у исследователей, занятых получением трансгенных животных, несмотря на то, что он требует высокой квалификации и дорогостоящего оборудования. Это неудивительно — быстрота и надежность данного метода окупают все его недостатки. Первой и наиболее хорошо разработанной экспериментальной системой для получения трансгенных животных явилась мышь.

Процесс получения трансгенных мышей с помощью микроинъекции схематически показан на рис. 18.1. Донорных мышей-самок с экспериментальной суперовуляцией скрещивают с самцами-производителями, через 12 ч после спаривания вскрывают яйцеводы, выделяют оплодотворенные яйцеклетки и помещают их в культуру. Далее в больший из двух пронуклеусов (обычно мужской) инъецируют очищенную клонированную ДНК. Ооциты, пережившие инъекцию, возвращают в естественную среду, пересаживая их в яйцевод псевдобеременной (12 ч после коитуса) реципиентной самки. Псевдобеременных самок получают, спаривая половозрелых самок со стерилизованными самцами.

Часть трансплантированных ооцитов продолжает развиваться положенное время, и затем рождаются детеныши — естественным образом или с помощью операции. Трансгенных животных в помете идентифицируют, используя специфичную ПЦР и гибридизационный анализ высокомолекулярной геномной ДНК, выделенной из тканей хвоста.

После того как первичные трансгенные животные идентифицированы, проводят их скрещивание для получения трансгенных линий. Разумеется, такие линии должны быть получены прежде, чем животное-основатель будет умерщвлено для детального исследования. Лучше, если животное-основатель — самец, поскольку его можно быстро скрестить с несколькими самками, тогда как самка — основатель линии должна выносить и выкормить хотя бы один помет, прежде чем ее можно будет забить. Желательно провести гибридизационный анализ и идентифицировать трансгенных животных первого поколения еще при жизни родителей.

В большинстве случаев 50 % потомков, полученных от скрещивания животных-основателей с животными дикого типа, оказываются

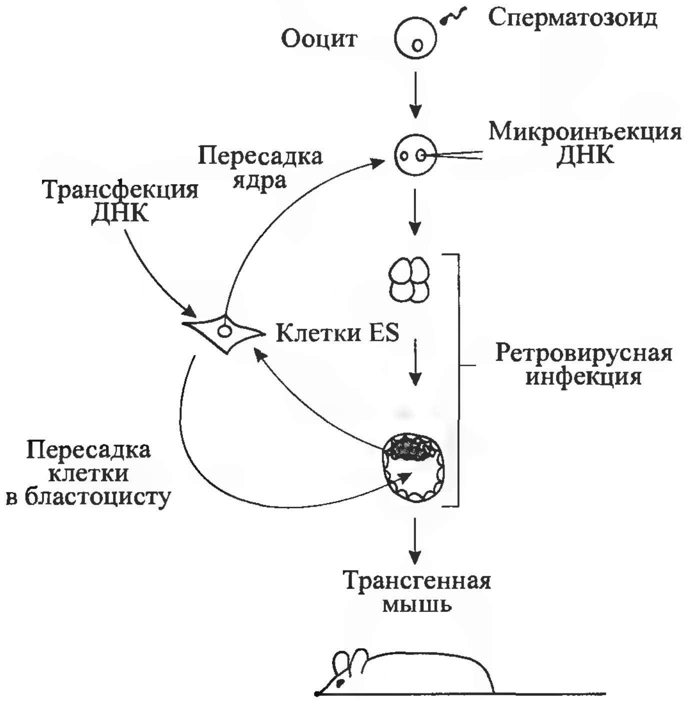


Рис. 18.1. Пути введения чужеродных генов в клетки млекопитающих на предымплантационной стадии развития

трансгенными, причем как родитель-основатель, так и потомки первого поколения гетерозиготны по трансгену. Однако необходимо иметь в виду, что некоторые трансгенные животные-основатели являются мозаичными и, следовательно, трансгенным окажется меньшая часть потомства первого поколения. Всех детенышей следует анализировать, пока не будет выведена гомозиготная линия. В ряде случаев гомозиготные линии получить не удается, поскольку от 5 до 15 % трансгенных инсерций в гомозиготном состоянии летальны.

Точный механизм, обеспечивающий интеграцию инъецированной ДНК в хромосомы клетки-хозяина, неизвестен, однако некоторое представление о характере процесса можно составить на основе анализа структурной организации ДНК, интегрированной в геном трансгенных мышей. Примерно у 70 % трансгенных мышей во всех соматических клетках и клетках зародышевого пути имеется экзогенная ДНК, что свидетельствует о том, что интеграция обычно происходит до первого цикла репликации ДНК. Остальные 30 % трансгенных животных обнаруживают ту или иную степень мозаичности, что, вероятно, является следствием интеграции ДНК на более поздних стадиях. Количество копий трансгена в геноме сильно варьирует и может достигать нескольких тысяч. В то же время в клетках первичных трансгенных животных обычно имеется только один участок интеграции; множественные копии трансгена, как правило, представляют собой серию тандемных повторов внутри единственного локуса. Участок интеграции в геноме клетки-хозяина, по всей видимости, строго не детерминирован и определяется случайным образом. Интеграционные события наблюдались во многих аутосомах, а также в X- и Y-хромосомах.

Эффективность процедуры получения трансгенных мышей путем микроинъекций сильно варьирует от эксперимента к эксперименту. В оптимальных условиях инъекцию переживает 60–80 % яйцеклеток, из них 10–30 %, имплантируясь в организм реципиентной самки, продолжает нормально развиваться и дает начало потомству. 10–30 % новорожденных мышей оказываются трансгенными.

18.1.3. Эмбриональные стволовые клетки

При создании трансгенных животных используют также плюрипотентные эмбриональные стволовые клетки (ES-клетки), взятые из бластоцисты. ES-клетки можно культивировать *in vitro* и после необходимых манипуляций вернуть в организм, инъецируя их в бластоцисту. Клетки колонизируют эмбрион и участвуют в его нормальном развитии, давая начало клеткам всех типов соматических тканей и нередко клеткам зародышевого пути. Прежде чем инъецировать ES-клетки в бластоцисту, в них вводят целевые трансгены — либо путем трансфекции, либо инфицируя их рекомбинантными ретровирусами. Практическое достоинство этой методической схемы состоит в том, что она дает возможность проводить селекцию трансформированных ES-клеток по определенному параметру. Это может быть число копий трансгена, его хромосомная локализация или характер экспрессии. Все получаемые по такой схеме первичные трансгенные животные — мозаичные организмы, которые состоят из содержащих и не содержащих трансген клеток; поэтому для получения чистых трансгенных линий необходима селекционная работа. Между тем довольно часто ES-клетки оказываются не способными колонизировать зародышевые ткани, что, по всей вероятности, объясняется накоплением хромосомных нарушений в процессе культивирования и селекции *in vitro*.

Проблему мозаичности первичных трансгенных животных можно преодолеть, если использовать трансформированные и прошедшие селекцию ES-клетки в качестве доноров ядер (см. рис. 18.1). Ядра ES-клеток, несущие трансгены, способны колонизировать энуклеированные ооциты, которые затем продолжают свое нормальное развитие. В результате может получиться животное, в каждой клетке которого будет содержаться трансген.

18.1.4. Ретровирусы

Инфицирование предымплантированных эмбрионов рекомбинантными ретровирусами — относительно несложная процедура, не требующая дорогостоящего оборудования. Эмбрионы инфицируют следующим образом: восьмиклеточную морулу (см. рис. 18.1) освобождают от яйцевой оболочки и помещают в культуральную чашку с фибробластами, продуцирующими рекомбинантный ретровирус. После инфицирования эмбрионы, достигшие стадии бластоцисты, вводят в матку псевдобеременной самки; часть эмбрионов продолжает нормально развиваться и в положенный срок превращается в трансгенных детенышей.

В результате использования данной схемы часто формируется организм, мозаичный по числу и локализации вирусных встроек в клетках. Поэтому для получения чистых линий, пригодных для исследования экспрессии введенных генов, необходим масштабный аутбридинг.

18.2. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ В ТРАНСГЕННЫХ МЫШАХ

В 1981 г. Т. Вагнеру с соавторами удалось выявить в организме некоторых мышей, содержащих экзогенную ДНК, экспрессию генов тимидинкиназы вируса простого герпеса и β-глобина кролика. Однако уровень экспрессии этих генов в тканях животных был невысок. Но даже в таком варианте синтез β-глобина кролика приводил к повышению концентрации эритроцитов у мышей.

В другом эксперименте в результате инъекции в ооцит гибридного гена, состоящего из кодирующей последовательности гена *tk* вируса герпеса и промоторно-регуляторной области гена металлотионеина 1 мыши, получена трансгенная мышь, в печени и почках которой вирус-специфический фермент продуцировался на высоком уровне. Экспрессия гена *MT-1* металлотионеина контролируется на транскрипционном уровне ионами тяжелых металлов и глюкокортикоидными гормонами. Показано, что гибридный ген, состоящий из регуляторной области *MT-1* и структурной части гена *tk*, в ооцитах мыши подвержен регуляции ионами кадмия, как и нативный ген *MT-1*. После инкубации ооцитов с ионами кадмия выявляемая в них активность тимидинкиназы вируса герпеса увеличивалась примерно в 10 раз.

Промоторно-регуляторную область гена *MT-1* использовали Р. Палмитер с соавторами (1982 г.) для создания эффективно экспрессируемого *in vivo* гена гормона роста и введения его в геном мыши. Структурную часть хромосомного гена гормона роста крысы подстроили к 5′-концевой регуляторной области гена *MT-1*, сконструнровав гибридную плазмиду pMGH (рис. 18.2). Из pMGH выделяли *Bgl*II–*Bam*HI-фрагменты, содержащие гибридный ген, и инъецировали их в 170 оплодотворенных ооцитов мыши (примерно 600 копий гена на ооцит), которые помещали в репродуктивный тракт самок. В результате развилось 21 животное, и 7 из них были трансгенными.

Определение копийности интегрированного гена *MGH*, количества мРНК и целевого белка в клетках трансгенных мышей показано, что имеется корреляция между копийностью чужеродного гена и уровнем его экспрессии *in vivo* (табл. 18.1).

Для достижения высокой продукции гормона роста в корм мышам добавляли $ZnSO_4$, активирующий транскрипцию гена *MT-1*. Шесть особей трансгенных мышей достигли значительно бóльших размеров, чем мыши контрольной группы, а уровень гормона роста в крови у некоторых животных в 100–800 раз превышал контроль. Как оказалось, даже без использования цинковой диеты трансгенные мыши вырастали до более крупных размеров, чем контрольные. Результаты данного исследования показали, что транскрипция гибридного гена *MGH* инициировалась с промотора гена металлотионеина 1 и продолжалась до участка терминации транскрипции гена гормона роста, четыре интрона правильно сплайсировались и мРНК *MGH* полиаденилировалась.

Некоторые из гигантских мышей были частично стерильны, другие же были способны давать потомство. Один из трансгенных самцов (MGH-10) передал ген гормона роста 10 из 19 потомков, что указывает на стабильную интеграцию гена *MGH* в одну из ее хромосом.

Рассмотренная работа — первое исследование, в котором генно-инженерным способом удалось кроме изменения генотипа добиться также изменения фенотипа реципиентных животных. Разработанный подход является достаточно общим и может быть распространен на другие виды животных. Необычно высокий уровень гормона роста, обнаруженный в сыворотке крови некоторых трансгенных мышей, указывает на возможность использования данного подхода для наработки различных важных полипептидов в организме животных.

Г. Мак-Найт с соавторами в 1983 г. получили трансгенных мышей, содержащих ген трансферрина курицы. Данный ген состоит из 17 экзонов. Трансферрин синтезируется конститутивно в печени и секретируется в сыворотку крови всех позвоночных. Ген трансферрина курицы, клонированный в плазмиде, вводили в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки мыши путем микроинъекции и имплантировали ооцит в самку. 15–30 % потомства из таких ооцитов содержали

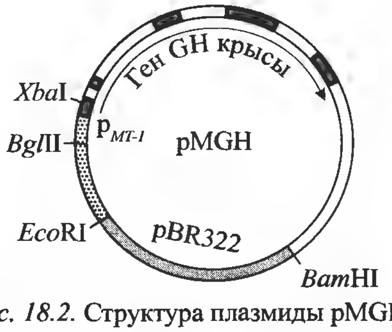


Рис. 18.2. Структура плазмиды pMGH.

Черные блоки — экзоны гена гормона роста крысы; p_{MT-1} — промотор гена металлотионеина 1 мыши

Таблица 18.1. **Характеристика трансгенных мышей, продуцирующих гормон роста крысы**

Особь	Число генов *MGH* на клетку	Число молекул мРНК *MGH* на клетку	Концентрация гормона роста, мкг/мл	Масса, г	Отношение к массе контрольных животных
MGH-2, ♀	20	800	57,00	41,2	1,87
MGH-3, ♀	1	< 50	0,87	22,5	1,02
MGH-10, ♂	8	< 50	0,28	34,4	1,32
MGH-14, ♂	2	< 50	0,31	30,6	1,17
MGH-16, ♂	2	< 50	17,90	36,4	1,40
MGH-19, ♂	10	1500	32,00	44,0	1,69
MGH-21, ♀	35	3000	112,00	39,3	1,78
Контроль					
Самки ($n = 3$)	0	0	$0{,}16 \pm 0{,}1$	$22{,}0 \pm 0{,}8$	—
Самцы ($n = 11$)	0	0	$0{,}15 \pm 0{,}08$	$26{,}0 \pm 2{,}0$	—

последовательность ДНК курицы. Шесть из семи изученных трансгенных мышей экспрессировали чужеродный ген, и у пяти мышей в печени уровень трансферрина курицы был в 5–10 раз больше, чем в других тканях. Куриный трансферрин секретировался в сыворотку крови и достигал концентрации 67 мкг/мл. Потомство трансгенных родителей также экспрессировало данный чужеродный ген.

И. Сола с соавторами (1998 г.) создали мышей, несущих два трансгена, которые представляли собой экспрессируемые кассеты, содержащие под контролем промотора тканеспецифичного гена β-лактоглобулина последовательности кДНК тяжелой или легкой цепи IgA, нейтрализующего гастроэнтеритный коронавирус (transmissible gastroenteritis coronavirus, TGEV). Совместной инъекцией обеих конструкций в ооциты были получены 23 трансгенные мыши, в геном 17 из которых были интегрированы оба трансгена, а 10 из них передавали оба гена потомкам. У всех потомков во время лактации в молоко секретировались антитела, эффективно нейтрализующие TGEV. Селектированные мыши продуцировали до 6 мг противовирусных антител в 1 мл молока. Кроме создания животных — продуцентов специфичных иммуноглобулинов в молоке использованный подход может быть реализован для получения трансгенных животных, обеспечивающих лактогенный иммунитет потомства против инфекционного энтерита.

За прошедшие годы накоплено очень много экспериментальных данных по экспрессии экзогенных ДНК в трансгенных мышах. Установлено, что примерно половина всех линий трансгенных мышей не экспрессирует трансген. По-видимому, это связано либо с присутствием в трансгене ингибиторных последовательностей (например некоторых последовательностей прокариотического происхождения), либо с особенностями конкретного сайта интеграции трансгена: экзогенная ДНК может встроиться в транскрипционно неактивные области хромосом. Если же экзогенная ДНК экспрессируется в трансгенном организме, этот процесс в большинстве случаев контролируется присутствующими в ней регуляторными элементами. Тем не менее прилежащие последовательности клеточной ДНК способны оказывать влияние на экспрессию трансгена. В ряде случаев наблюдаются неожиданные отклонения в характере экспрессии чужеродных последовательностей в трансгенных организмах, которые, вероятно, обусловлены эффектом положения трансгена в геноме клетки-хозяина, например взаимодействием трансгена с эндогенным энхансером (см. 14.1.1).

Размер и локализация последовательностей, необходимых для обеспечения правильной экспрессии, зависят от природы гена. Некоторые гены, например инсулина, эластазы и αA-кристаллина, «обходятся» несколькими сотнями пар нуклеотидов, предшествующих началу гена. Для других генов требуется 5′-концевая регуляторная зона гораздо большего размера. Некоторые гены, например глобиновые гены человека, нуждаются не только в 5′-концевых регуляторных зонах, предшествующих началу гена, но также и в последовательностях, расположенных за точкой инициации транскрипции.

18.3. ТРАНСГЕННЫЕ ЖИВОТНЫЕ В ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Трансгенная технология несет в себе большие возможности, в первую очередь для фундаментальных научных исследований. Эксперименты с трансгенными мышами призваны обеспечить прогресс в молекулярной биологии и генетике млекопитающих. Этому, в частности, способствует развитие следующих направлений научного поиска:

- анализ *цис*-действующих контролирующих элементов, ответственных за тканевую специфичность — временную и физиологическую регуляцию экспрессии генов;
- анализ физиологических последствий (на уровне целого организма) различных отклонений в экспрессии генов, в том числе онкогенов;
- получение случайных новых мутантов, возникающих в популяции трансгенных мышей в результате внедрения трансгена в последовательность того или иного функционального гена (мутировавший ген можно выделить, используя трансген в качестве гибридизационной пробы);
- получение мутантов с направленно инактивированными генами — так называемых ***нокаутных*** (от англ. knock out — выбить) животных.

18.3.1. Нокаутные мыши

Сложность генома млекопитающих, их эмбрионального развития, длительный период, предшествующий размножению, и трудности изучения большого числа индивидуальных животных делают генетический анализ этих систем затруднительным. Направленная инактивация генов является чрезвычайно важным методическим приемом, применяемым для получения трансгенных животных. Наибольшее развитие такие работы получили в экспериментах на мышах. Создание линий мышей, гомозиготных по направленно инактивированному гену, позволяет изучать детерминируемые данным геном свойства на уровне организма. Благодаря появлению методологии получения нокаутных мышей молекулярная генетика этой удобной лабораторной модели стала развиваться небывалыми темпами.

Схема получения нокаутных мышей выглядит следующим образом. Фрагмент целевого гена, который планируют инактивировать *in vivo*, извлекают из геномной библиотеки мыши на основе фага λ, космид и т. п. Внутрь этого фрагмента встраивают доминантный селективный маркер, одновременно часть целевого гена делетируется. В результате получают гибридную плазмиду, в которой к селективному маркеру справа и слева присоединены сегменты целевого мышиного гена (фланкирующие последовательности). Такую конструкцию часто называют ***нацеленным вектором*** (targeting vector). Для повышения эффективности гомологичной рекомбинации фланкирующих последовательностей с хромосомным геном нацеленный вектор обычно расщепляют какой-либо рестриктазой вне фрагмента встройки для перевода его из кольцевой в линейную форму. Полученную линейную ДНК вводят (чаще всего электропорацией) в культуру эмбриональных стволовых клеток мыши (см. рис. 18.1) и на селективной среде отбирают клоны трансформантов. С помощью ПЦР и блоттинга по Саузерну выявляются трансформанты, образовавшиеся в результате гомологичной рекомбинаци, приведшей к инсерционно-делеционной инактивации целевого гена. Отбираемые клоны гетерозиготны по мутантному гену, так как инактивирующая встройка происходит в одну из гомологичных хромосом. ES-клетки с направленной мутацией инъецируют в бластоцисты, которые затем помещают в яйцевод псевдобеременных самок. Родившихся химерных мышей скрещивают с мышами исходной линии и получают гетерозиготное потомство по целевому мутантному гену. Этих гетерозигот скрещивают между собой и отбирают в потомстве гомозиготных по мутантному гену мышей. На каждом этапе генотип мутантных мышей определяют с помощью ПЦР и блоттинга по Саузерну, используя образцы геномной ДНК, выделяемой из биоптатов хвоста животных.

По описанной схеме Х. Такада с соавторами (2003 г.) осуществили направленную инактивацию гена *SODD* у мышей (рис. 18.3).

Кроме молекулярно-генетического анализа нокаутные мыши могут быть полезны при создании линий, более чувствительных к тому или иному инфекционному агенту человека или животных, чем исходные животные. Для разработки новых методов терапии и оценки эффективности кандидатных вакцин крайне важно иметь удобную лабораторную модель, что часто представляет большую проблему. Одним из примеров реализации такого подхода является работа П. Хофмана с соавторами (2003 г.), в которой были получены нокаутные мыши, дефектные по

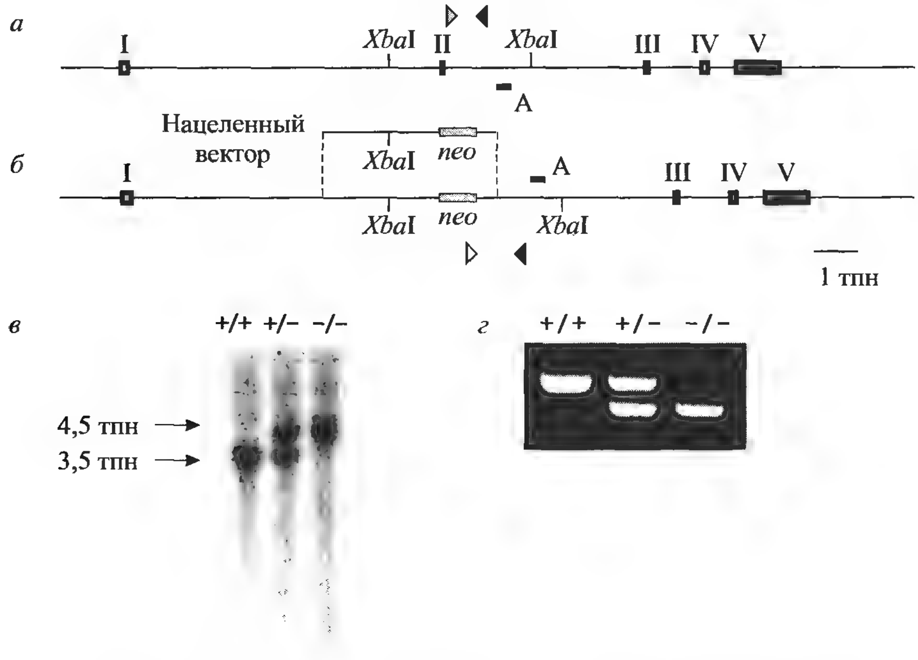


Рис. 18.3. Создание мутантных мышей с нарушенным геном *SODD*:

а — экзонная структура гена *SODD* дикого типа; *б* — мутантный ген, полученный после рекомбинационной интеграции нацеленного вектора, содержащего интронные последовательности; *в* — результат анализа ДНК из хвоста мышей блоттингом по Саузерну (геномную ДНК гидролизовали рестриктазой *Xba*I, фракционировали электрофорезом в геле агарозы и гибридизовали с радиоактивно меченным олигонуклеотидом А); *г* — ПЦР-генотипирование мышиной ДНК. I–V — экзоны; А — специфичный гибридизационный зонд; «+/+» — дикий тип, «+/–» — гетерозиготный мутант, «–/–» — гомозиготный мутант; *треугольники* — олигонуклеотидные праймеры для ПЦР

гену интерлейкина 12. Такие мыши оказались удобной высокочувствительной моделью колонизации слизистой желудка бактериями *Helicobacter pylori*, способствующими развитию язвенной болезни желудка у человека. Геном данной бактерии полностью секвенирован. Поэтому созданная лабораторная модель позволит изучить молекулярные факторы патогенности этой бактерии и разработать новые методы терапии вызываемых этой бактерией заболеваний.

В целом следует заключить, что возможность направленной инактивации генов мышей в результате гомологичной рекомбинации революционизировало изучение генетического контроля развития и физиологии млекопитающих. Однако использование технологии получения нокаутных животных не всегда обеспечивает положительный результат. Это обусловлено тем, что инактивация ряда генов приводит к летальному эффекту. Кроме того, вводимый селективный маркер может влиять на фенотипическое проявление мутации. Данные ограничения можно преодолеть, создавая систему регулируемого включения–выключения целевого гена в процессе индивидуального развития животного во всем организме или в определенных органах.

18.3.2. Регулируемое включение–выключение генов *in vivo*

Первый метод контролируемой модуляции экспрессии трансгена *in vivo* был разработан М. Лаксо с соавторами в 1992 г. Ими остроумно были использованы свойства рекомбиназы Cre бактериофага P1, которая без дополнительных факторов катализирует реципрокную рекомбинацию между специфичными локусами кроссинговера *lox*P этого фага. Последовательность *lox*P состоит из двух инвертированных повторов длиной 13 пн, разделенных спейсерным районом из 8 пн. Если между двумя участками *lox*P, расположенными в прямой ориентации, имеется участок ДНК, то в присутствии Cre происходит выщепление этого участка и в исходной ДНК остается одна копия локуса *lox*P.

Для изучения возможности системы *cre/lox* активировать молчащий трансген в мыши авторы создали три гибридные конструкции. В первых двух кодирующую последовательность гена *cre* встроили под контроль промотора либо гена *mαA* мышиного αA-кристаллина (экспрессируется тканеспецифично в хрусталике глаза), либо раннего гена цитомегаловируса человека (hCMV) (рис. 18.4). В третьей плазмиде последовательность *TAg*, кодирующую большой

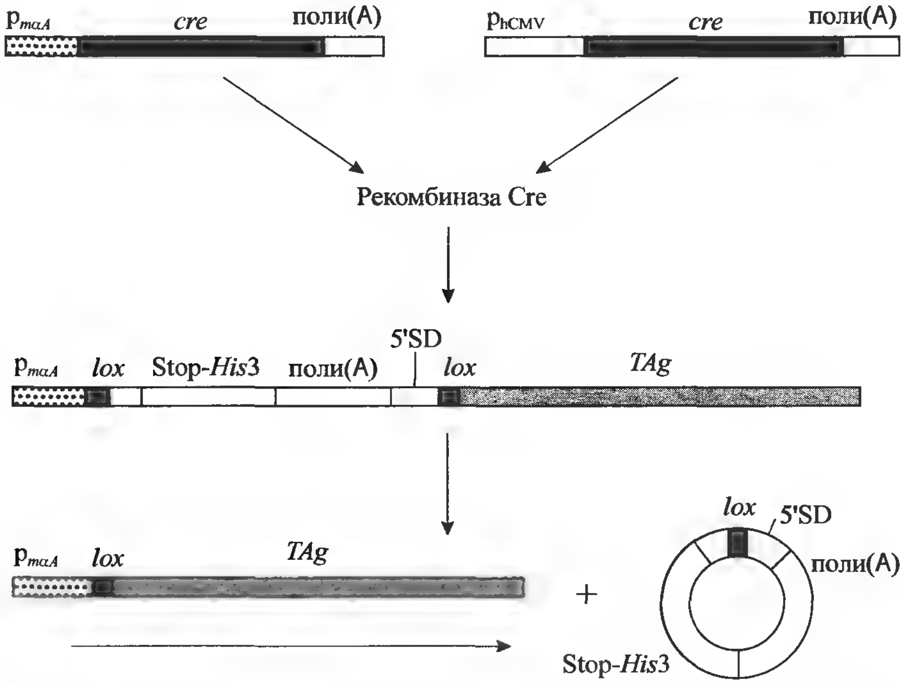


Рис. 18.4. Создание системы *cre/lox* для регулируемой экспрессии трансгена

Т-антиген вируса SV40, встроили под контроль промотора гена *maA*, но между этими двумя элементами поместили так называемую Stop-последовательность, ограниченную с двух сторон участками *lox*P. Stop-последовательность содержала сегмент размером 550 пн из 3′-концевой части гена *HIS*3 дрожжей, усиливающий эффективность терминации транскрипции, инициируемой с промотора p_{maA}, на участке поли(А) вируса SV40. Чтобы более надежно предотвратить продукцию *TAg*, был встроен также синтетический фрагмент ДНК, содержащий инициаторный триплет ATG и 5′-концевой донорный сайт сплайсинга 5′SD (см. рис. 18.4).

Используя каждую из созданных конструкций, после инъекции линейных фрагментов ДНК в оплодотворенные ооциты получили трансгенных мышей. Особей, содержащих конструкцию p_{maA}–Stop–*TAg*, скрещивали с мышами, экспрессирующими *cre* под контролем промотора p_{maA} или p_{hCMV}. Все потомки таких скрещиваний, несущие два трансгена, имели катаракту, обусловленную синтезом *TAg*, который вызывает злокачественную трансформацию хрусталика. У мышей, несущих один трансген p_{maA}–Stop–*TAg*, никаких патологий не наблюдали. Было показано, что в результате тканеспецифичной экспрессии у мышей, содержащих трансгены p_{maA}–Stop–*TAg* и p_{maA}–*cre*, вырезание Stop-последовательности происходило селективно лишь в хрусталике. При совмещении в одном геноме трансгенов p_{maA}–Stop–*TAg* и p_{hCMV}–*cre* выщепление Stop-последовательности происходило и в других тканях животных.

В дальнейшем группа исследователей под руководством П. Шамбона модернизировала систему сайтспецифической рекомбинации *cre/lox*, основываясь на данных о том, что различные белки, объединенные с лигандсвязывающим доменом рецептора эстрогенов (estrogen receptor, ER), подвержены регуляции этими гормонами. Используя кДНК человеческого ER и ген *cre* фага P1, в 1995 г. исследователи создали ген, в котором под контролем промотора p_{hCMV} находилась последовательность *cre*–ER. Созданную плазмиду pCre-ER совместно с селективной по гигромицину плазмидой котрансформировали путем электропорации в культуру клеток эмбриональной карциномы мыши F9, содержащую интегрированный в целевой ген блок *lox*P–p_{tk}*neo*–*lox*P (ген устойчивости к неомицину под контролем промотора гена *tk*, фланкированный сегментами *lox*P в прямой ориентации). На среде с гигромицином отбирали и анализировали котрансформанты, содержащие ген *cre*–ER. Химерный белок Cre–ER рекомбиназной активностью не обладал. После обработки отобранных культур клеток эстрадиолом или синтетическим лигандом 4-гидрокситамоксифеном (4-hydroxytamoxifen, OHT) эффективно индуцировалась рекомбиназная активность Cre–ER и происходило выщепление гена p_{tk}*neo*, что обнаруживалось по утрате устойчивости к G-418 и подтверждалось блоттингом по Саузерну.

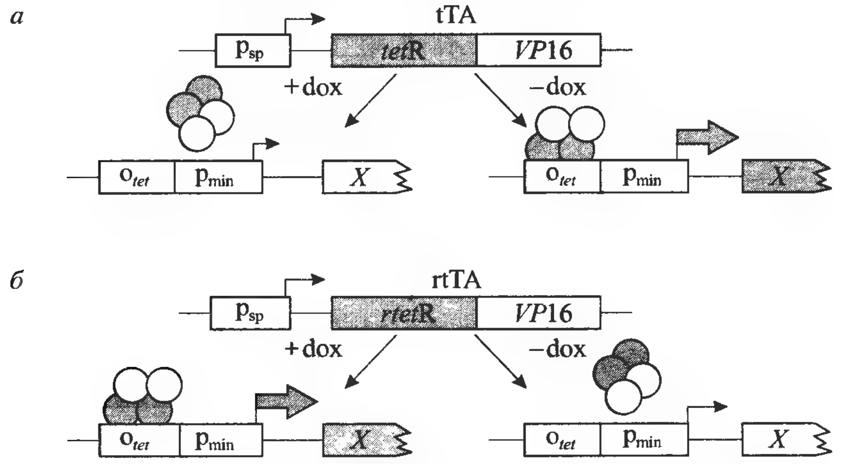


Рис 18.5. Системы регулируемой транскрипции целевых генов:

а — механизм действия тетрациклин-контролируемого трансактиватора tTA (при отсутствии доксициклина (dox) tTA взаимодействует с операторным районом o_{tet} и активирует транскрипцию с промотора $p_{hCMV^{*}\text{-}1}$ (p_{min}) целевого гена *X*; введение dox приводит к ингибированию транскрипции целевого гена); *б* — rtTA-регулируемая система транскрипции (см. 13.3.5).

p_{sp} — тканеспецифичный промотор

В организме животных присутствует эндогенный эстрадиол. Поэтому для регулируемой экспрессии *in vivo* П. Шамбон с сотрудниками создали в 1996 г. вариант химерного белка, обозначенный Cre–ER^{T}, в котором в результате точечной замены Gly521 → Arg521 в лигандсвязывающем домене человеческого ER произошло изменение специфичности связывания: такой белок уже не связывался с эстрадиолом, но сохранил способность связываться с синтетическими лигандами OHT и тамоксифеном.

Были получены трансгенные мыши, экспрессирующие *cre–ER*^{T} под контролем промотора раннего гена hCMV. Затем этих животных скрестили с трансгенными мышами, содержащими маркерный ген p_{tk}*neo*, фланкированный участками *lox*P. У мышей, несущих оба трансгена, при внутрибрюшинном введении OHT наблюдали исключение гена *neo* во всех органах, кроме тимуса. У контрольных мышей, которым не вводили лиганд, выщепления маркерного гена не обнаружили.

Разработанный методический прием стали использовать для регулируемого выщепления целевых хромосомных генов или их частей, заключенных между участками *lox*P. Например, в 2001 г. группа П. Шамбона для изучения дифференцировки *in vivo* адипоцитов (клеток жировой ткани) получила мышей, содержащих трансген *aP2–cre–ER*^{T} (*cre–ER*^{T} под контролем промотора гена, продукт которого связывает жирные кислоты в адипоцитах), а также трансгенных мышей с дупликацией *lox*P в составе гена *RXRα* рецептора ретиноида X. После скрещивания созданных трансгенных линий получили потомство, содержащее тканеспецифично экспрессируемый *cre–ER*^{T} и *lox*P-фланкированный *RXRα*. После обработки тамоксифеном у трансгенных мышей направленно инактивировался ген *RXRα* только в адипоцитах, но не в других тканях организма. Мыши, утратившие *RXRα* в адипоцитах, были устойчивы к диетически или химически индуцируемому ожирению.

Широкое распространение получила система тетрациклин-зависимой регуляции экспрессии трансгенов в организме животных, разработанная ранее для культур клеток млекопитающих (см. 13.3.5). Х. Бужард с сотрудниками испытали обе системы антибиотик-зависимых трансактиваторов транскрипции (рис. 18.5).

В 1994 г. были получены трансгенные мыши, несущие репортерные гены люциферазы или β-галактозидазы под контролем промотора $p_{hCMV\text{-}1}$, а также мыши, содержащие кодирующую последовательность трансактиватора tTA (см. рис. 13.12) под контролем промоторно-энхансерной области гена *IE*1 hCMV. После скрещивания получали мышей, содержащих два трансгена: p_{hCMV}–*tTA* и один из репортерных генов. В каждом случае в тканях двойных трансгенных мышей наблюдали активную экспрессию репортерных генов. При введении в организм таких животных терапевтических доз тетрациклина выявляли эффективное подавление активности репортерных генов.

В 1996 г. эти же исследователи создали трансгенных мышей, у которых кроме репортерного гена люциферазы имелся трансген *tTA* под контролем клеточного промотора p_{LAP}, содержащего *цис*-действующий элемент, направляющий транскрипцию с него в печени. Во всех исследованных органах двойных трансгенных мышей продукция люциферазы была в 200–10 000 раз меньше, чем в печени. Эти результаты впервые показали возможность тканеспецифичной регуляции экспрессии трансгена с помощью разработанной тетрациклин/доксициклин-зависимой системы.

Данная система регуляции экспрессии трансгенов широко используется в различных экспериментах. Так, Х. Джу с соавторами (2001 г.) создали двойных трансгенных мышей, содержащих не только ген *tTA*, но и ген *rVCH* химазы сосудов крысы (rat vascular chymase). Для полученных мышей было характерно повышенное кровяное давление (гипертензия). Введение этим мышам доксициклина приводило к подавлению экспрессии трансгена *rVCH* (см. рис. 18.5) и нормализации кровяного давления. На основании полученных результатов сделано заключение, что ген *rVCH* может быть терапевтической мишенью при гипертонической болезни.

Рассмотренные системы регулируемой экспрессии трансгенов применяются во многих лабораториях. Такой подход позволяет исследовать тонкие механизмы воздействия продуктов того или иного гена на физиологию и эмбриональное развитие млекопитающих.

18.4. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Трансгенная технология представляет интерес не только для фундаментальной науки. Она открывает широкие перспективы для развития целого ряда прикладных областей, в частности биотехнологии и сельского хозяйства. Однако, по-видимому, пройдет еще немало времени, прежде чем трансгенные животные займут подобающее им место в системе сельскохозяйственного производства.

В 1988 г. впервые удалось получить трансгенных овец, продуцирующих с молоком фактор свертывания крови, необходимый для лечения людей, больных гемофилией. В последующие годы в мире было создано около 20 типов трансгенных коров, коз, свиней, овец и кроликов, которые продуцировали такие ценнейшие фармацевтические вещества, как тканевой активатор плазминогена, различные моноклональные антитела, эритропоэтин, инсулиноподобный фактор роста, интерлейкины, антитрипсин и др. Работы в этом направлении продолжаются, и спектр лекарственных веществ, полученных с помощью трансгенных сельскохозяйственных животных, расширяется. Однако традиционная технология создания трансгенных животных путем микроинъекции генных конструкций в пронуклеус зиготы является очень трудоемкой и малоэффективной, и это существенно тормозит внедрение новых разработок в практику промышленного производства. Достаточно отметить, что полного развития достигает менее 1 % зигот, трансдуцированных чужеродным геном. Кроме того, даже при наличии специальных промоторов, обеспечивающих экспрессию чужеродных генов преимущественно в секреторных клетках молочной железы (промоторы генов казеинов, лактальбуминов, лактоглобулина и др.), трансгенные особи часто оказываются нежизнеспособными или у них нарушается репродуктивная функция.

Примером неудач при создании трансгенных животных может служить получение во ВНИИ животноводства овец, трансгенных по гену химозина с промотором β-казеина. Химозин — ключевой фермент сыроделия, и традиционно его выделяют из слизистой оболочки сычуга забитых молочных телят и ягнят. Очевидно, что эта технология является устаревшей и неэффективной. Поэтому были созданы трансгенные по гену химозина овцы романовской породы, которых скрестили с овцами цыгайской и остфриняндской молочных пород. На всех этапах селекции была отмечена устойчивая экспрессия химозина в молочной железе гибридных самок (300 мг/мл). Полученные препараты использовали для изготовления сыра, качество которого оказалось высоким. Однако молочная продуктивность трансгенных животных была в 8–10 раз ниже, чем у интактных особей, по причине закупорки значительного числа альвеол и молочных протоков в результате свертывания молока. Гистологический анализ молочной железы трансгенных овец выявил островки функционирующей секреторной ткани, где шел нормальный процесс образования молока. Резкое снижение молочной продуктивности трансгенных овец было обусловлено торможением биосинтеза молока в альвеолах, заполненных твердой субстанцией. Теоретиче-

ски этого быть не должно, так как химозин выделяется в виде прохимозина, который не обладает свертывающей активностью и превращается в активный химозин только при pH 4,0–4,5; однако в молочной железе трансгенных овец такая кислотность не выявлялась.

Следует отметить, что у животных, в том числе у овец, процесс образования молока начинается в последней трети беременности, поэтому молоко с прохимозином длительное время находится в альвеолах и молочных протоках. Было сделано предположение, что при повышенной температуре молочной железы какая-то, может быть незначительная, часть прохимозина трансформируется в химозин, и этого бывает достаточно для начала процесса свертывания молока и закупорки альвеол и молочных протоков. В последующем эта гипотеза нашла экспериментальное подтверждение. Если удастся устранить это препятствие, в перспективе могут быть созданы коммерческие стада овец, производящие химозин. Этот пример свидетельствует о том, какие трудности могут возникнуть при создании и эксплуатации трансгенных животных — продуцентов биологически активных веществ.

Хотя рекомбинантные белки могут быть экспрессированы в разных тканях трансгенных животных, продукция целевых белков в молочной железе с секрецией в молоко остается самым привлекательным способом получения белков, важных прежде всего для медицинских целей. В такой системе рекомбинантные белки легко собирать и очищать. Например, коза в период лактации может произвести до 800 л молока в год при содержании в нем рекомбинантного белка около 5 г/л, т. е. около 4 кг этого белка в год. Таким образом, относительно небольшое стадо трасгенных коз может продуцировать в составе молока сотни килограммов рекомбинантного белка в год при его низкой стоимости. Главной проблемой пока остается создание такого стада и его сохранение.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Мерфи Д., Хэнсон Дж. Получение трансгенных мышей путем микроинъекции клонированной ДНК в оплодотворенные яйцеклетки // Новое в клонировании ДНК. Методы / Под ред. Д. Гловера. М.: Мир, 1989. С. 308–353.

Эрнст Л. К. Фенотрансгены — новое направление генной инженерии сельскохозяйственных животных // С.-х. биол. 2002. № 2. С. 3–7. (Сер. Биология животных).

Albanese C., Hulit J., Sakamaki T., Pestell R. G. Recent advances in inducible expression in transgenic mice // Semin. Cell Develop. Biol. 2002. Vol. 13. P. 129–141.

Brady H. J. M., Pennington D. J., Dzierzak E. A. Transgenic mice as models of human immunodeficiency virus expression and related cellular effects // J. Gen. Virol. 1994. Vol. 75. P. 2549–2558.

Feil R., Brocard J., Mascrez B. et al. Ligand-activated site-specific recombination in mice // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. P. 10887–10890.

Furth P. A., Onge L. St., Boger H. et al. Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1994. Vol. 91. P. 9302–9306.

Hoffman P. S., Vats N., Hutchison D. et al. Development of an interleukin-12-deficient mouse model that is permissive for colonization by a motile KE26695 strain of *Helicobacter pylori* // Infect. Immun. 2003. Vol. 71. P. 2534–2541.

Houdebine L.-M. Antibody manufacture in transgenic animals and comparison with other systems // Curr. Opin. Biotechnol. 2002. Vol. 13. P. 625–629.

Imai T., Jiang M., Chambon P., Metzger D. Impaired adipogenesis and lipolysis in the mouse upon selective ablation of the retinoid X receptor α mediated by a tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase (Cre-ER^{T2}) in adipocytes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2001. Vol. 98. P. 224–228.

Jaenisch R. Transgenic animals // Science. 1988. Vol. 240. P. 1468–1474.

Ju H., Gros R., You X. et al. Conditional and targeted overexpression of vascular chymase causes hypertension in transgenic mice // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2001. Vol. 98. P. 7469–7474.

Kistner A., Gossen M., Zimmermann F. et al. Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. P. 10933–10938.

Lakso M., Sauer B., Mosinger B. et al. Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1992. Vol. 89. P. 6232–6236.

Larrick J. W., Thomas D. W. Producing proteins in transgenic plants and animals // Curr. Opin. Biotechnol. 2001. Vol. 12. P. 411–418.

Liu X., Alexander V., Vijayachandra K. et al. Conditional epidermal expression of TGFβ1 blocks neonatal lethality but causes a reversible hyperplasia and alopecia // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2001. Vol. 98. P. 9139–9144.

McKnight G. S., Hammer R. E., Kuenzel E. A., Brinster R. I. Expression of the chicken transferrin gene in transgenic mice // Cell. 1983. Vol. 34. P. 335–341.

Metzger D., Clifford J., Chiba H., Chambon P. Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1995. Vol. 92. P. 6991–6995.

Pollock D. P., Kutzko J. P., Birck-Wilson E. et al. Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies // J. Immunol. Meth. 1999. Vol. 231. P. 147–157.

Sola I., Castilla J., Pintado B. et al. Transgenic mice secreting coronavirus neutralizing antibodies into the milk // J. Virol. 1998. Vol. 72. P. 3762–3772.

Stewart T. A., Hollengshead P. G., Pitts S. L. et al. Transgenic mice as a model to test the immunogenicity of proteins altered by site-specific mutagenesis // Mol. Biol. Med. 1989. Vol. 6. P. 275–281.

Takada H., Chen N.-J., Mirtsos C. et al. Role of SODD in regulation of tumor necrosis factor responses // Mol. Cell. Biol. 2003. Vol. 23. P. 4026–4033.

Глава 19
ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ

Растения имеют очень важное преимущество перед животными в экспериментальной биологии. Из недифференцированных соматических тканей, полученных из единичных клеток растения, возможна регенерация *in vitro* с образованием полноценных фертильных растений. Это свойство — тотипотентность — открывает для молекулярных биологов большие возможности в создании генетически модифицированных растений.

Ключевую роль в развитии генетической инженерии растений сыграло изучение механизмов переноса специфичных фрагментов плазмидной ДНК из бактерии *Agrobacterium tumefaciens* в ядро растительной клетки с последующей их интеграцией в хромосомную ДНК. Выяснение основных закономерностей этого процесса позволило создать относительно простую и надежную систему введения чужеродных генов в клетки растений с последующей селекцией растений, содержащих целевой трансген и называемых поэтому трансгенными растениями. В этой главе будут рассмотрены особенности генно-инженерных экспериментов по получению трансгенных растений.

19.1. ПЕРЕНОС ГЕНОВ В РАСТЕНИЯ ИЗ БАКТЕРИЙ РОДА *AGROBACTERIUM*

A. tumefaciens являются грамотрицательными почвенными бактериями. Они существуют в ризосфере растений и у двудольных способны вызвать заболевание, называемое корончатым галлом (от англ. crown). В природе инфекционный процесс, обусловленный вирулентными агробактериями, начинается при повреждении растения и ведет к образованию опухолевых разрастаний в районе соединения стебля и корня. Экспериментально установлено, что галлы могут формироваться также в любом месте повреждения растения при попадании в него агробактерий.

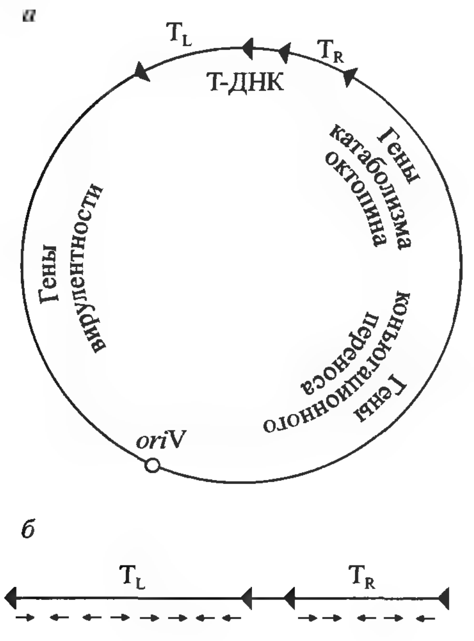


Рис. 19.1. Схема плазмиды Ti октопинового типа (*а*) и ее области Т-ДНК (*б*).

T_L, T_R — левая и правая Т-ДНК; треугольниками обозначены последовательности левой и правой границ Т-ДНК; гены, экспрессируемые с Т-ДНК, обозначены горизонтальными стрелками

Патогенность *A. tumefaciens* для растений Э. Смит и К. Таунсенд выявили в 1907 г. В 1940-х гг. была выдвинута гипотеза о том, что растительные клетки трансформируются в результате того, что бактерия вводит в них некий агент, индуцирующий опухоль.

Клетки корончатых галлов во многих отношениях напоминают раковые клетки животных. Они приобретают способность к неограниченному нерегулируемому росту. Когда клетки ко-

рончатых галлов культивируют *in vitro*, они растут в отсутствие специальных гормонов, которые необходимы при культивировании нормальных растительных клеток. Более того, клетки корончатых галлов продолжают сохранять эти свойства (трансформированный фенотип), даже если убить агробактерии антибиотиками. Изучение природы индуктора опухолей *A. tumefaciens* позволило установить в 1974 г., что собственно опухолеродным агентом у этой бактерии является плазмида Ti (от англ. tumor inducing), размер которой обычно составляет 200–250 тпн (рис. 19.1).

М. Чилтон с соавторами в 1977 г. обнаружили, что плазмида Ti содержит так называемую Т-ДНК (transferred DNA), размер которой в разных плазмидах варьирует от 10 до 30 тпн. Ti-плазмиды могут содержать как единичные, так и множественные копии Т-ДНК. Т-ДНК, прежде всего за счет активности примерно 35 генов вирулентности *vir*, расположенных на плазмиде Ti, способна передаваться в растительную клетку с последующей встройкой в хромосомы ядра. Т-ДНК ограничена с обеих сторон несовершенными прямыми повторами длиной 25 пн (рис. 19.2), называемыми правой и левой границами (right и left borders, RB и LB). Несмотря на

RB 5'... GXX TGXCAGGATATATXXXXXXGTXAXX ... 3'
LB 5'... XGG TGGCAGGATATATXXXXXTGTAAAX ... 3'

Рис. 19.2. Последовательности правой (RB) и левой (LB) границ Т-ДНК.

Выделены несовершенные прямые повторы

то, что RB и LB схожи по последовательности нуклеотидов, используются они по-разному. Делеция правой границы приводит к прекращению переноса Т-ДНК, тогда как делеция левой границы практически не влияет на этот процесс.

Т-ДНК кодирует ферменты синтеза фитогормонов, индуцирующих опухолевое разрастание трансформированных тканей растения, а также ферменты синтеза необычных аминокислот и сахаров (опинов). Тип опина, синтезируемого в опухоли (например, нопалин, октопин, агроцинопин, манопин и агропин), зависит от штамма агробактерий, вызывающего его образование. Опины, образующиеся из аргинина — октопин и нопалин, — легче всего обнаружить в ткани корончатых галлов. В соответствии с этим многие широко распространенные штаммы *A. tumefaciens* классифицируют как штаммы октопинового или нопалинового типа. Штаммы агробактерий, вызывающие образова-

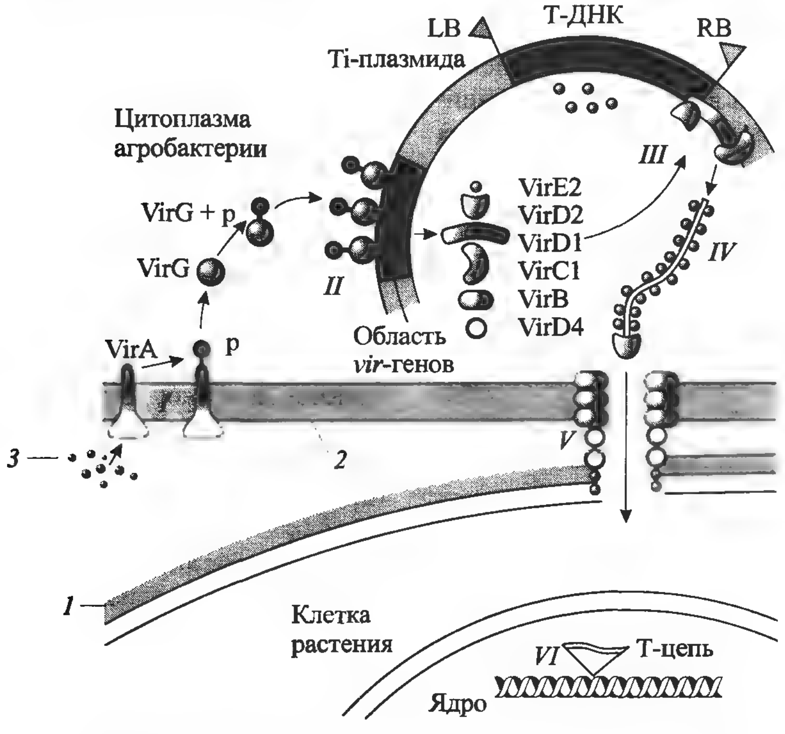


Рис. 19.3. Основные этапы агробактериальной трансформации:

I — активация хеморецептора VirA продуктами гидролиза клеточной стенки растения; *II* — фосфорилирование VirG; *III* — внесение однонитевого разрыва в районе RB, репликация с вытеснением Т-цепи; *IV* — связывание с Т-цепью белков VirE2 и VirD2 и транспорт к поре; *V* — прохождение Т-цепи в комплексе с белками в растительную клетку; *VI* — интеграция Т-цепи в хромосому растения.

1 — клеточная стенка растений; *2* — оболочка клетки агробактерии; *3* — сигнальные молекулы растительной клетки

LB 5'... CGGCAGGATATATTCAATTGTAAAT...
... GCCGTCCTATATAAGTTAACATTTA... 5'

RB 5'... TGGCAGGATATATACCGTTGTAATT...
... ACCGTCCTATATATGGCAACATTAA... 5'

Рис. 19.4. Места расщепления Т-ДНК в районе левой и правой границ.

Подчеркнуты последовательности, входящие в Т-цепь

ние опухолей растений, способны избирательно катаболизировать опины, синтез которых они индуцируют, и использовать их в качестве источника углерода и азота.

Гены ферментов биосинтеза гормонов и опинов, кодируемых Т-ДНК, хотя и находятся в бактерии, эволюционно адаптированы для экспрессии только в растительных клетках. Такие особенности агробактерии позволяют назвать ее природным генным инженером.

Гены, определяющие присоединение агробактерий к растительной клетке и образование целлюлозных фибрилл, расположены как в Т-ДНК, так и на бактериальной хромосоме. Исследования механизма переноса Т-ДНК из агробактерий в клетку растения показали, что вирулентность контролируется на уровне транскрипции генов *vir*. При повреждении из растительной ткани выделяется сок с кислой реакцией (рН 5,0–5,8) и высокой концентрацией различных фенольных соединений, таких как лигнин и предшественники флавоноидов. Эти условия специфически стимулируют экспрессию генов *vir* агробактерий. Наиболее эффективным индуктором *vir* является моноциклическое производное фенола ацетосирингон, с которым взаимодействует продукт гена *vir*A, передавая сигнал внутрь клетки (рис. 19.3). Это приводит к активации продукта гена *vir*G, что в свою очередь активирует остальные гены вирулентности. Белок VirD2 в комплексе с белками VirC1 и VirD1 вносит одноцепочечные разрывы в нуклеотидные последовательности правой и левой границ Т-ДНК (рис. 19.4). Синтезируется новая цепь Т-ДНК, а старая с присоединенным к 5′-концу VirD2 вытесняется (рис. 19.5). Процесс повторяется, и в клетке накапливается одноцепочечная Т-ДНК, готовая к переносу. Затем комплекс Т-ДНК с белками VirD2 и VirE2 направленно (от правой границы к левой) переносится в клетку растения с помощью процесса, сходного с бактериальной конъюгацией (см. рис. 19.3). Перенос происходит через пили, образованные полипептидом VirD4 и белковыми продуктами оперона *vir*B, а затем через канал в клеточной мембране растения, сформированный белком VirE2. Проникновение Т-ДНК в ядро растительной клетки опосредовано полипептидами VirD2 и VirE2. Эти же белки обеспечивают стабильную встройку перенесенной ДНК в геном растения. Сайты инсерции Т-ДНК случайны, хотя ряд авторов отмечают преимущественное внедрение Т-ДНК в транскрипционно активные области генома.

Экспериментально установлено, что последовательность ДНК, заключенная между RB и LB, никак не влияет на эффективность переноса Т-ДНК из агробактерии в клетку растения. Это позволило предположить, что Т-ДНК можно использовать для переноса чужеродных генов из *A. tumefaciens* в геном растительных клеток.

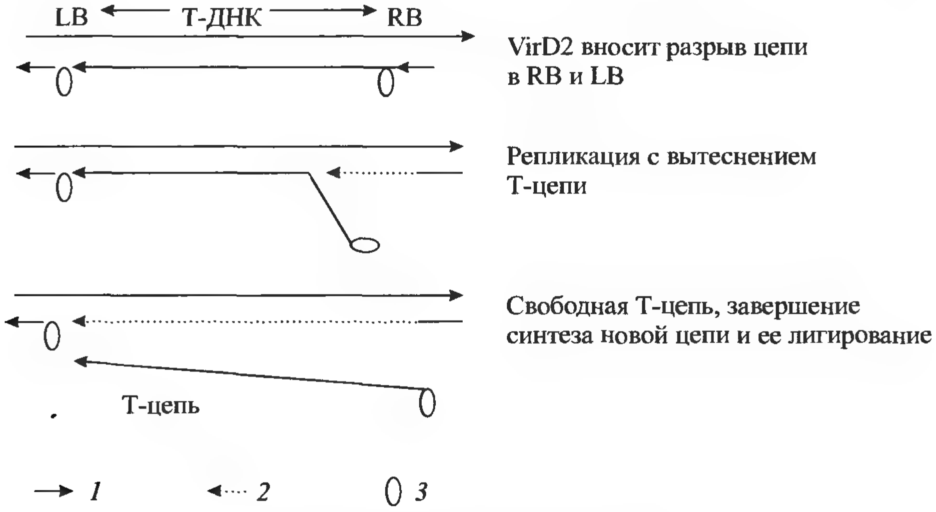


Рис. 19.5. Схема синтеза Т-цепи:

1 — Т-ДНК; *2* — вновь синтезированная цепь ДНК; *3* — белок VirD2

19.2. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЛАЗМИД Ti *A. TUMEFACIENS* ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Поскольку плазмиды Ti имеют очень большой размер, районы Т-ДНК обычно не содержат уникальных участков гидролиза рестриктазами. Поэтому прямая встройка целевого гена в Т-ДНК на плазмиде Ti практически невозможна. Исходя из этого учеными были разработаны разные стратегии введения чужеродных генов в состав Т-ДНК, из которых сформировались два главных направления экспериментальных исследований.

Первое направление состоит в введении целевого гена в Т-ДНК в составе плазмиды Ti. Для этого, например, фрагмент Т-ДНК с уникальным участком гидролиза какой-либо рестриктазой клонировали в клетках *E. coli* в векторной плазмиде с широким кругом хозяев для грамотрицательных бактерий. По уникальному участку гидролиза выбранной рестриктазой встраивали целевой ген, предназначенный для интеграции в геном растения. Созданную гибридную плазмиду путем конъюгации или трансформации вводили в клетки *Agrobacterium*, содержащие плазмиду Ti со встроенным в нее (например, транспозицией) геном устойчивости к определенному антибиотику, и отбирали клоны агробактерий, растущие на среде с антибиотиками, гены устойчивости к которым несли первая и вторая плазмиды. Затем выявляли клоны агробактерий, содержащие плазмиды, которые за счет одиночного кроссинговера по областям гомологии в Т-ДНК образовали коинтегранты. В данном случае кроме целевого гена в Т-ДНК плазмиды Ti вводится дополнительная генетическая информация, которая не требуется для получения трансгенных растений. Данная ***коинтегративная векторная система*** вследствие относительной сложности анализа получаемых *in vivo* гибридных плазмид Ti не нашла широкого применения.

Новый импульс развитию генетической инженерии растений дала разработка альтернативной стратегии использования *Agrobacterium* для доставки целевых генов в растительные клетки. В 1983 г. А. Хоекама с соавторами и А. де Фреммонд с соавторами независимо друг от друга обнаружили, что Т-ДНК и гены *vir* могут находиться в агробактерии на двух разных репликонах (в *транс*-положении), и при этом происходит эффективный перенос в растения Т-ДНК. А. Хоекама с соавторами назвали основанный на этом подход ***бинарной векторной системой***. Плазмиду, содержащую Т-ДНК, называют бинарным вектором, а плазмиду, несущую гены *vir*, — помощником (хелпером). Хелперная плазмида представляет собой плазмиду Ti с делецией всей Т-ДНК или ее части, т. е. она обеспечивает все функции переноса Т-ДНК, но не содержит последней. Такая плазмида Ti называется ***обезоруженной***.

Большинство генно-инженерных экспериментов на растениях выполнено с использованием более простой бинарной векторной системы *A. tumefaciens*. Основные манипуляции *in vitro* при этом проводятся в клетках *E. coli*. Бинарный вектор представляет собой относительно небольшую плазмиду, способную реплицироваться в клетках *E. coli* и *A. tumefaciens*. Обязательными элементами бинарного вектора являются последовательности RB и LB Т-ДНК, ограничивающие район, содержащий ген селективного маркера, экспрессируемый в растениях, промоторы и сигналы полиаденилирования мРНК, между которыми по уникальным участкам гидролиза рестриктазами встраивают целевую кодирующую последовательность. Поскольку интеграция Т-ДНК происходит с большой точностью по правой границе и с меньшей — по левой, целевой ген предпочитают

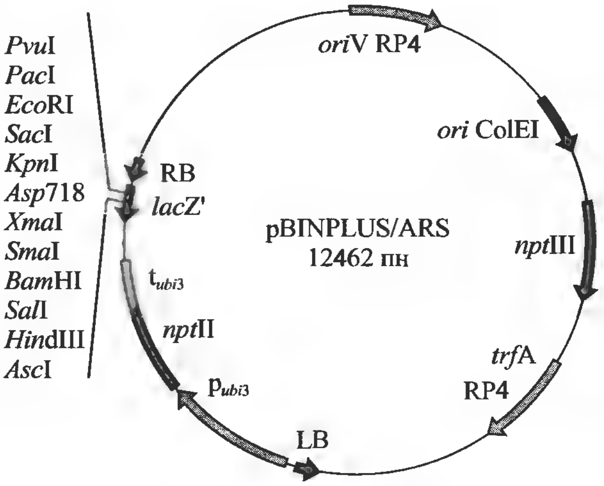


Рис. 19.6. Структура бинарного вектора агробактериальной трансформации растений.

RB, LB — концевые повторы Т-ДНК плазмиды Ti; *ori*V, *trf*A — генетические элементы плазмиды с широким кругом хозяев RP4, обеспечивающие ее репликацию; *npt*III — ген устойчивости к канамицину, функционирующий в бактериях; p_{ubi3}–*npt*II–t_{ubi3} — гибридный ген, экспрессирующийся в растениях и обеспечивающий устойчивость к канамицину; p_{ubi3}, t_{ubi3} — промотор и терминатор гена *ubi3*, кодирующего убиквитин

Таблица 19.1. **Примеры использования селективиых маркеров в векторах для трансформации растений**

Селективный маркер	Субстраты (селективные агенты)	Чувствительность ткани контрольного растения, мкг/мл	Конструкции	Резистентность, обеспечиваемая гибридной конструкцией, мкг/мл
Ген неомицинфосфотрансферазы II (*npt*II)	Неомицин Канамицин[1] G-418	50–250 5–35 3–10	p_{nos}[2]–*npt*II/*nos* poly(A) $p_{35S\text{-}CaMV}$[3]–*npt*II/*nos* poly(A)	75–1000
Ген гигромицинфосфотрансферазы (*hpt*)	Гигромицин-В	3–10	p_{nos}–*hpt*/*nos* poly(A) $p_{19S\text{-}CaMV}$–*hpt*/*nos* poly(A)	30–100
Ген устойчивости к блеомицину (*ble*)	Блеомицин	1–5	$p_{35S\text{-}CaMV}$–*ble*/*nos* poly(A)	5–10
Ген дигидрофолатредуктазы (*dhfr*)	Метотрексат[1] Триметоприм	0,01–0,5 8–16	p_{nos}–*dhfr*/*nos* poly(A)	0,05–0,5

[1] Антибиотик, по которому оценивался уровень резистентности, обеспечиваемый гибридной конструкцией.

[2] *nos* — ген нопалинсинтетазы.

[3] CaMV — вирус мозаики цветной капусты.

располагать у RB, а селективный маркер ближе к LB. Такое расположение значительно повышает надежность отбора трансгенных растений с целевой встройкой на соответствующей селективной среде. Кроме того, бинарный вектор содержит ген, обеспечивающий селекцию трансформантов бактерий, и плазмидный репликатор широкого круга хозяев либо два репликатора, функционирующих соответственно в *E. coli* (чаще всего ColE1-типа для высокой копийности и простоты манипуляций с плазмидой) и *A. tumefaciens*. Типичный бинарный вектор представлен на рис. 19.6. Для селекции трансформированных растений чаще всего используют гены устойчивости к канамицину и гигромицину, реже — к блеомицину, метотрексату, гентамицину, спектиномицину и др., подстроенные под промоторы генов растений (табл. 19.1). Селекцию бактерий, несущих бинарные векторы и гибриды на их основе, осуществляют в зависимости от структуры векторной плазмиды на средах с антибиотиками канамицином, ампициллином, тетрациклином, хлорамфениколом и др. Эти гены устойчивости проявляются только в бактериальных клетках.

Следует отметить, что Т-ДНК успешно переносится в клетки растений даже при очень большом размере встройки. Так, в 1992 г. А. Миранда с соавторами первыми показали, что при изменении ориентации участка RB Т-ДНК в растения может переноситься полная копия плазмиды Ti. В 1996 г. К. Гамильтон с соавторами, используя бинарную векторную систему, осуществили перенос из *Agrobacteium* в растительные клетки фрагментов хромосомной ДНК человека размером до 150 тпн.

19.3. ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ БИНАРНОЙ ВЕКТОРНОЙ СИСТЕМЫ *A. TUMEFACIENS*

На первом этапе наибольшее число работ по созданию трансгенных растений было выполнено на табаке *Nicotiana tabacum*. Это связано как с простотой манипуляций в культуре табака при проведении генетической трансформации, так и с высокой эффективностью регенерации трансформированных растений на селективных средах.

Многие типы растительных клеток (покоящиеся клетки паренхимы, меристем, камбия) находятся в недетерминированном состоянии. Такие клетки способны дифференцироваться различным образом в зависимости от внешнего воздействия. Они могут переходить в экспланте (от лат. ex — вне, plantare — сажать) к дедифференцировке и росту в виде каллуса (рис. 19.7, *а*), а затем и суспензионной культуры. Из недифференцированных тканей многих видов растений в определенных условиях можно регенерировать целые растения.

В эксплантах из предсуществующих меристем возможен рост в виде полностью дифференцированных структур (рис. 19.7, *б*). Инициация развития примордиев дополнительных ор-

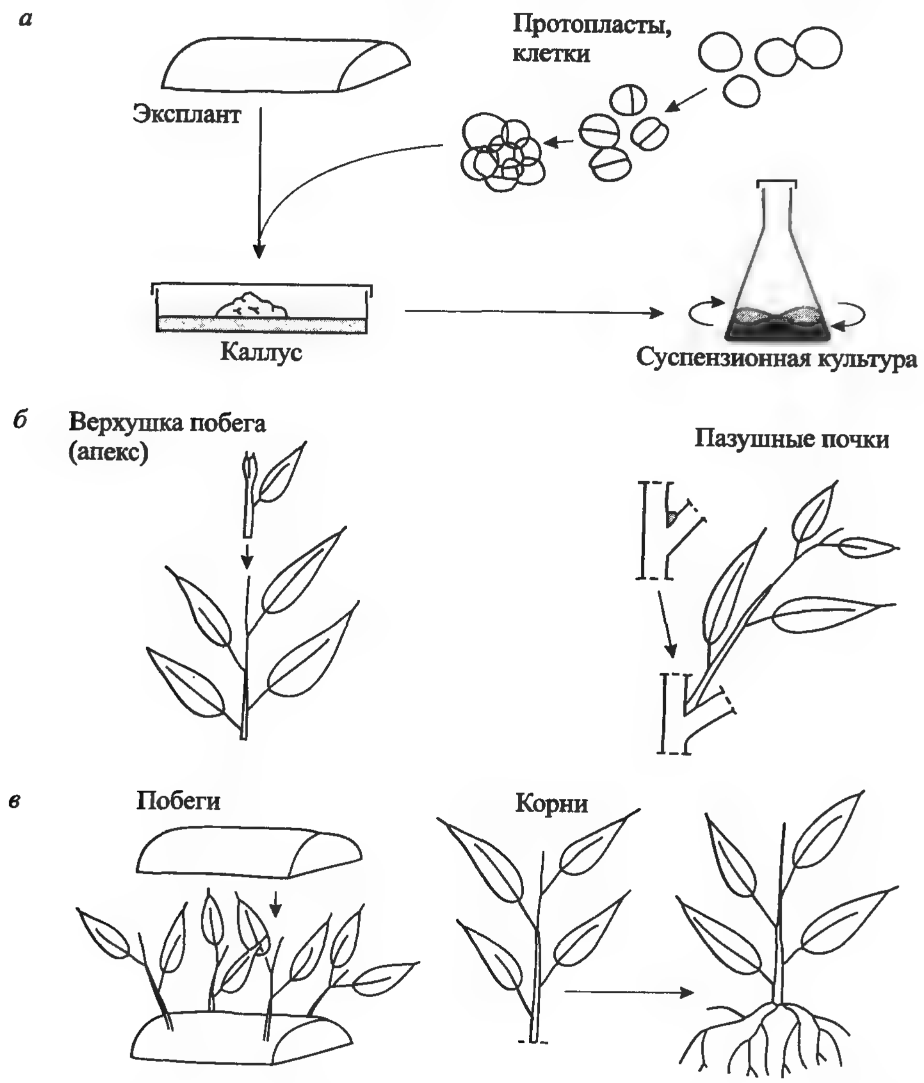


Рис. 19.7. Основные типы роста эксплантов растений в культуре:
а — рост из недифференцированных клеток и тканей; *б* — развитие уже существующих органов; *в* — развитие адвентивных органов

ганов возможна непосредственно из клеток экспланта без промежуточной стадии каллуса (рис. 19.7, *в*). Все эти варианты в той или иной комбинации используют при манипулировании с растениями в эксперименте.

Для экспериментов по трансформации *Nicotiana tabacum*, а также других пасленовых особенно удобны листовые диски, полученные от растений, размножаемых *in vitro* или в теплицах. При культивировании на соответствующих средах в области срезов листовых дисков быстро формируется каллус. На среде для регенерации побегов вблизи срезанных краев фрагментов листа через некоторое время появляются побеги вместе с сопутствующим каллусом (рис. 12 на цв. вклейке). Листовые пластинки табака не содержат покоящихся почек или преформированных зачатков органов, и, следовательно, большинство побегов, формирующихся у края среза, происходит из дедифференцированных клеток. Данные клетки высокочувствительны к трансформации *A. tumefaciens*. Побеги, вырастающие на селективной среде после инкубации листовых дисков с культурой векторных агробактерий, дают начало растениям, ДНК которых затем проверяют в ПЦР на наличие встройки целевого и селективного генов, используя специфичные для каждого гена пары олигонуклеотидных праймеров.

В отличие от табака для других видов растений, даже пасленовых — картофеля и томатов, сложно подобрать условия регенерации из каллуса на селективных средах после агробактериальной трансформации. Поэтому используют другие, более трудоемкие процедуры. Например, для получения трансформантов томатов иногда применяют так называемый ***метод «фламинго»***. В этом случае полученные из се-

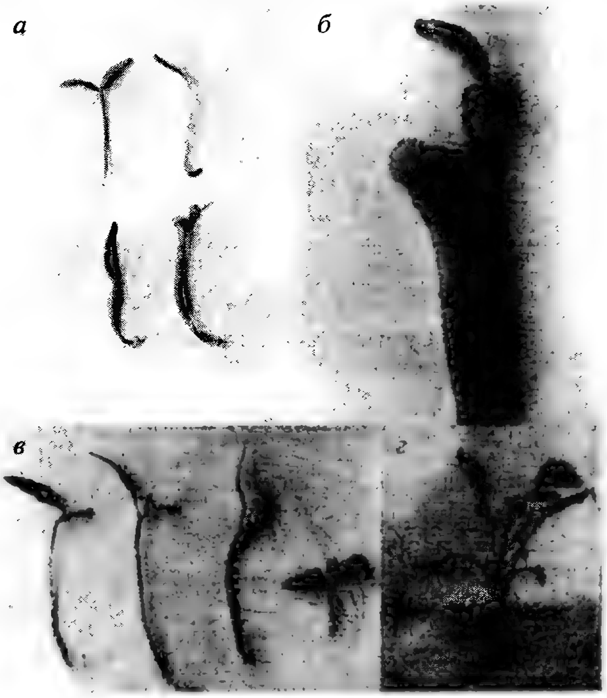


Рис. 19.8. Получение регенерантов томата методом «фламинго»:

а — интактный, ампутированный проросток томата и проросток с началом регенерации;
б — формирующийся регенерант;
в — этапы роста регенеранта на проростке;
г — отделенный регенерант на селективной среде.
Фото предоставлены Н. И. Рекославской

мян проростки томатов размером 3–4 см с четко выраженными семядолями отбирают для агробактериальной трансформации. Стерильной бритвой делают косой срез, отсекающий через точку роста одну из семядолей (рис. 19.8, *а*). В итоге образуется достаточно обширная раневая поверхность, на которую наносят культуру *A. tumefaciens*, содержащую бинарный вектор с хелперной плазмидой Ti, и выдерживают определенное время. Инфицированные экспланты помещают на агаризованную питательную среду, содержащую канамицин (или другое токсичное соединение, используемое для селекции трансгенных растений) и антибиотик, убивающий агробактерии (обычно цефатоксим или карбенициллин). На раневой поверхности образуются регенеранты, которые через 2–3 нед. отделяют от родительского растения и переносят на среду для укоренения (рис. 19.8, *б*–*г*). Укоренившиеся на селективной среде растения подвергают анализу на наличие целевых встроек в хромосомной ДНК. Выход трансгенных растений при использовании данного метода невелик, поэтому приходится инфицировать большое количество эксплантов и тщательно анализировать регенерировавшие растения. Чтобы избежать возможной мозаичности получаемых регенерантов по встройке целевого гена, необходимо выращивать их до получения семян. Семена проращивают на селективной среде; выросшие растения анализируют на наличие встройки целевого гена и оценивают уровень его экспрессии по продукции специфичных мРНК и белка.

Многие однодольные растения, в частности кукуруза, рис, ячмень и пшеница, при инфицировании разными вирулентными штаммами *Agrobacterium* не поддерживают рост корончатых галлов, но могут быть генетически трансформированы при агробактериальном переносе генов устойчивости к антибиотикам или гербицидам. По мере адаптации разработанных методов круг видов растений, вовлекаемых в генно-инженерные эксперименты с использованием агробактериальной системы трансформации, постоянно расширяется.

19.4. ЭКСПРЕССИЯ И НАСЛЕДОВАНИЕ ЧУЖЕРОДНЫХ ГЕНОВ, ВВЕДЕННЫХ В РАСТЕНИЯ В СОСТАВЕ Т-ДНК

В экспериментах по экспрессии трансгенов в растениях первоначально использовали хорошо охарактеризованные конститутивные промоторы ДНК-содержащего вируса мозаики цветной капусты, обеспечивающие транскрипцию молекул 35S и 19S РНК, или промоторы опиновых синтетаз. С развитием исследований стали использовать также регулируемые тканеспецифичные промоторы, например, клубнеспецифичный промотор гена пататина картофеля или промотор гена *E8*, индуцируемый при созревании плодов томатов.

Агробактериальная трансформация растений приводит к интеграции Т-ДНК или гибридов на ее основе в различные участки разных хромосом. Каждое трансгенное растение индивидуально по месту встройки и числу встроенных копий Т-ДНК. Некоторые особи могут содержать единичную встройку гибридной Т-ДНК, в то время как другие — низкокопийные тандемные повторы Т-ДНК. Уровень экспрессии трансгена может значительно варьировать у разных трансгенных растений, полученных в одном эксперименте, при этом он часто не коррелирует с копийностью, а зависит от положения трансгена в растительном геноме (близость или удаленность от сильных промоторов, усилителей или глушителей транскрипции и т. п.).

При изучении трансгенных растений обнаружили эффект ***сайленсинга*** (от англ. silencing — замолкание) трансгена в последующих поколениях, т. е. у ряда индивидуальных трансгенных растений может происходить снижение уровня или полное прекращение синтеза целевого белка, кодируемого встроенным трансгеном. Механизмы замолкания гена могут быть разными. Например, встройка двойной копии трансгена в ориентации «голова к голове» (инвертированный повтор) приведет к нестабильности конструкции и выщеплению трансгена. Это рекомбинационный сайленсинг. Метилирование промотора трансгена, обусловленное встройкой Т-ДНК в активно метилируемые районы генома растения, приведет к транскрипционному сайленсингу. Специфичное расщепление мРНК, в которое вовлекаются низкомолекулярные двухцепочечные молекулы РНК, вызывает посттранскрипционный сайлесинг трансгена. Такой механизм наиболее часто встречается у трансгенных растений, полученных прямым переносом ДНК, так как в этом случае интегрируется большое число трансгенов и образуются множественные повторы.

Учитывая возможность замолкания трансгена, в каждом эксперименте необходимо получать как можно больше трансгенных растений и тестировать уровень экспрессии встроенного гена. При этом по сравнению с исходными трансформантами (поколение Т0) более надежные результаты будут получены при анализе растений следующих поколений (Т1 или Т2), выросших на селективной среде из семян.

19.5. ПРЯМОЙ МЕТОД ВВЕДЕНИЯ ТРАНСГЕНА В РАСТЕНИЯ

На первых этапах развития генетической инженерии растений возникали большие сложности в осуществлении агробактериальной трансформации различных видов растений, и в первую очередь однодольных. Поэтому были предприняты попытки найти более универсальный метод введения молекул ДНК в клетки растений. В 1987 г. Дж. Сэнфорд с соавторами разработали метод бомбардирования микрочастицами и опробовали его на тканях лука. В качестве мишени был использован монослой больших эпидермальных клеток. Затем этот методический прием был успешно реализован на многих видах растений, а также на бактериях, грибах и даже животных. Современные варианты приборов для бомбардирования микрочастицами называют обычно генными пушками.

Для бомбардирования наиболее удобны химически инертные частицы золота диаметром 0,6–3 мкм, на которые адсорбируют молекулы ДНК. Этими частицами заряжают генную пушку, и после выстрела частицы пробивают клеточные стенки, ДНК попадает внутрь клетки и в конечном итоге — в ядро (или пластиды). Для многих исследований можно использовать более дешевый «носитель» ДНК — вольфрамовые микрочастицы, однако иногда они проявляют фитотоксичность.

Вводимые методом бомбардирования плазмиды обычно содержат гены, необходимые для размножения и селекции гибридных плазмид в бактериальных клетках, а также селективный и целевой гены, находящиеся под контролем промоторов и терминаторов транскрипции, функционирующих в растениях. В качестве селективного для трансформированных растений гена чаще всего используют ген устойчивости к канамицину.

Уже через час после бомбардирования в тканях растения может быть выявлена экспрессия вводимого трансгена, однако стабильная интеграция плазмидной ДНК наблюдается лишь в небольшой доле клеток, в которые она была введена. Это указывает на то, что бóльшая часть плазмид в клетке деградируется.

В клетке плазмидные ДНК рекомбинируют между собой и хромосомной ДНК. В результате плазмида может интегрироваться в хромосомную ДНК растения в индивидуальном или, чаще, в мультимерном виде. Встройка в хромосомную ДНК растений происходит случайным образом, как и в клетках млекопитающих. Метод бомбардирования позволяет осуществлять котрансформацию растений разными плазмидами, при этом плазмиды обычно встраиваются в геном растения как коинтегранты. На основании полученных результатов можно полагать, что механизм интеграции чужеродной ДНК в хромосомы клетки при прямом переносе плазмид, не содержащих протяженных областей гомологии с хромосомной ДНК, схож у растений, животных и дрожжей.

В отличие от агробактериальной системы трансформации растений, обеспечивающей достаточно надежное сохранение встраиваемых генов, прямой перенос приводит к значительно большему разнообразию вариантов встроенных структур, так как они чаще подвергаются реком-

бинациям и перестройкам. Поэтому при прямом введении трансгенов в клетки растений необходимо особенно тщательно осуществлять анализ встроек, используя большее число трансформантов. Это увеличивает трудоемкость экспериментов.

19.6. СИНТЕЗ В РАСТЕНИЯХ ЧУЖЕРОДНЫХ БЕЛКОВ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Для медицинских целей растения используют тысячи лет, но генетическая инженерия позволила создать новые растения, белковые продукты которых важны для терапии различных заболеваний. Гены терапевтически важных белков человека и животных можно вводить в разные системы экспрессии, каждая из которых имеет свои достоинства и недостатки. Идеальной является система экспрессии, которая наиболее безопасна и обеспечивает продукцию биологически активного продукта по минимальной цене. В системе клеток млекопитающих могут синтезироваться белки человека и животных, в максимальной степени схожие с природными, но культивирование таких клеток дорого и ограничено по масштабу. Бактерии можно производить в большом масштабе, но синтезируемые в них эукариотические белки далеко не всегда имеют правильную третичную структуру. Кроме того, они не могут подвергаться посттрансляционной модификации.

Продукция рекомбинантных белков в растениях имеет ряд потенциальных преимуществ перед другими системами экспрессии чужеродных генов. Растительные системы более дешевы по сравнению с культивированием в биореакторах (ферментерах). Все, что требуется для нормальной жизнедеятельности растений, — это минеральные соединения, содержащиеся в почве, вода, энергия солнечного света и углекислый газ.

В растениях возможна посттрансляционная модификация синтезируемых чужеродных полипептидов. Обязательным условием образования функционально активных белков является правильная укладка полипептидной цепи. У млекопитающих за это отвечают по крайней мере два шаперона — BiP/GRP78 и GRP94. В высших растениях сигнальные последовательности (например Lys–Arg–Glu–Leu на С-конце полипептида) направляют белки в эндоплазматический ретикулум, где обнаружены шапероны, гомологичные BiP/GRP78 и GRP94.

Важной особенностью растений по сравнению с культурами клеток млекопитающих и трансгенными животными является то, что в них не могут развиваться такие патогены человека и животных, как вирусы, прионы и др., что обеспечивает гораздо бóльшую безопасность генно-инженерных продуктов, выделенных из растений. Примеры растений — продуцентов терапевтически важных белков человека приведены в табл. 19.2.

Технологии сбора и обработки растений в больших масштабах уже существуют, что значительно упрощает и удешевляет работу с посевами трансгенных растений.

Белки, продуцируемые в семенах, клубнях, плодах, обладают значительной стабильностью и могут сохраняться в них без выделения длительное время.

Значительную долю в стоимость рекомбинантных белков медицинского назначения вносит их очистка. При синтезе некоторых белков в зерне риса, пшеницы, плодах томата, бананов и др. возможно их введение в организм алиментарным путем (с пищей) без предварительной очистки, что значительно снизит стоимость таких препаратов.

19.6.1. Терапевтические и диагностические антитела

Метод получения моноклональных антител в гибридомах разработали Г. Кохлер и К. Милстейн в 1975 г. Вследствие своей высокой специфичности и аффинности для широкого спектра антигенов, антитела и их фрагменты нашли широкое применение, и прежде всего для диагностических целей и терапии различных заболеваний. Учитывая потенциальные преимущества генно-инженерной системы растений, заманчиво было клетки млекопитающих при производстве антител заменить на растительные.

А. Хиатт с соавторами (1989 г.) первыми создали трансгенные растения табака, продуцирующие функционально активные моноклональные антитела IgG1. Для этого ДНК-копии матричных РНК, выделенных из мышиной гибридомы 6D4 и кодирующих легкую (каппа) и тяжелую (гамма) цепи иммуноглобулина IgG1, встроили в агробактериальный бинарный экспрессирующий вектор. Полученные гибридные конструкции для каждой цепи иммуноглобулина перенесли в клетки табака, на селективной среде отобрали

Таблица 19.2. **Примеры продукции трансгенными растениями белков человека для возможного терапевтического применения**

Заболевания, синдромы	Растение-хозяин	Белки	Уровень экспрессии	Год опубликования
Анемия	Табак	Эритропоэтин	< 0,01 % СРБ[1]	1997
Передозировка наркотиков	Арабидопсис (резушка)	Энкефалины	0,10 % белка семян	1997
Цирроз печени, ожоги, хирургические травмы	Табак	Сывороточный альбумин	0,02 % СРБ	1997
Кровопотеря	Табак	α-, β-глобин	0,05 % белка семян	1997
Гиперкоагуляция	Табак	Протеин С	< 0,01 % СРБ	1999
	Рапс	Гирудин (ингибитор тромбина)	0,30 % белка семян	1999
Вялое заживление ран	Табак	Эпидермальный фактор роста	< 0,01 % СРБ	1999
Гепатиты А и В	Рис, репа Табак	α-Интерферон β-Интерферон	Нет данных < 0,01 % СВ[2]	1999
Нарушение синтеза коллагена	Табак	Гомотримерный коллаген	< 0,01 % СВ	1999
Нейтропения	Табак	Гранулоцит-макрофаг-колониестимулирующий фактор	Нет данных	2000
Недостаток гормона роста	Табак	Соматотропин	< 0,01% СРБ	2000
Пузырный фиброз, заболевания печени, кровотечения	Рис	α1-Антитрипсин	Нет данных	2000
Предупреждение отторжения трансплантанта	Кукуруза	Апротинин (ингибитор трипсина)	Нет данных	2000
Бактериальные инфекции	Картофель	Лактоферрин	0,10 % СРБ	2000

[1] СРБ — суммарный растворимый белок.
[2] СВ — сырой вес.

трансгенные растения и охарактеризовали продукцию соответствующих целевых белков. Трансформанты, продуцирующие индивидуальные цепи иммуноглобулина, скрестили и получили потомство, экспрессирующее одновременно обе цепи. В таких растениях цепи обоих типов объединялись и образовывали функционально активные молекулы, специфично связывающиеся с соответствующими антигенами. Функциональные антитела в растениях табака накапливались в количестве, достигающем 1,3 % суммарного белка листьев. Экспериментально было установлено, что для сборки молекулы иммуноглобулина необходима секреция обеих цепей, т. е. каждая цепь должна синтезироваться в виде пребелка, на N-конце которого находится сигнальный пептид.

В дальнейшем в ряде лабораторий были получены трансгенные растения, которые продуцировали различные полноразмерные иммуноглобулины либо так называемые одноцепочечные вариабельные фрагменты (single-chain variable fragment, scFv) иммуноглобулинов, представляющие собой вариабельные области тяжелой и легкой цепей, соединенные линкерным пептидом. Данные о некоторых трансгенных растениях — продуцентах антител приведены в табл. 19.3. При испытаниях на добровольцах было показано, что антитела против *Streptococcus mutans* (основной агент, вызывающий кариес зубов), произведенные в растениях табака, после нанесения на зубы защищают их от кариеса по крайней мере в течение четырех месяцев. Синтезированные в растениях сои или кукурузы антитела против вируса герпеса второго типа в эксперименте предотвращали генитальный герпес у мышей. Эти результаты указывают на большую перспективность исследований по созданию растений, продуцирующих специфичные иммуноглобулины.

Таблица 19.3. **Примеры терапевтических и диагностических антител, синтезированных в растениях**

Применение	Специфичность	Сигнальная последовательность	Промотор	Обозначение и тип антигена	Растение-хозяин	Уровень экспрессии[1]	Год опубликования
Предотвращение зубного кариеса	Антиген I или II стрептококка	Сигнальный пептид IgG мыши	35S CaMV[2]	Guy's 13 (IgA)	Табак	500 мкг/г листьев	1995, 1998
Лечение рака толстой кишки	Поверхностный антиген	Сигнальный пептид IgG мыши; KDEL[3]	Субгеномный промотор белка оболочки TMV[4]	CO17-1A (IgG)	Табак	Нет данных	1998
Лечение и диагностика инфекции вирусом простого герпеса типа 2	—	Сигнальный пептид экстенсина табака	35S CaMV	Анти-HSV-2 (IgG)	Соя, кукуруза	Нет данных	1998
Лечение В-клеточной лимфомы (идиотипичные вакцины)	—	Сигнальный пептид α-амилазы риса	Субгеномный промотор белка оболочки TMV	38C13 (scFv)	Табак	30,0 мкг/г листьев	1999
ИФА-диагностика	Антитело против человеческого IgG	Сигнальный пептид IgG мыши	35S CaMV	C5-1 (IgG)	Люцерна	1,0 % суммарного растворимого белка	1999
Лечение рака	Раковый эмбриональный антиген	Сигнальный пептид IgG мыши; KDEL	Промотор гена убиквитина кукурузы	ScFvT84.66 (scFv)	Пшеница	900,0 нг/г листьев; 1,5 мкг/г семян	2000
	То же	То же	То же	То же	Рис	29,0 мкг/г листьев; 32,2 мкг/г семян	1999, 2000

[1] Оценивался на единицу сырого веса листьев или семян.
[2] CaMV — вирус мозаики цветной капусты.
[3] С-концевой пептид Lys–Arg–Glu–Leu, направляющий белок в ЭПР.
[4] TMV — вирус табачной мозаики.

Уровень продукции чужеродных полипептидов может существенно зависеть от вида растения или ткани, в которых они синтезируются. Например, один и тот же вид рекомбинантных антител в листьях трансгенного табака накапливался лишь до 0,04 % суммарного белка, в то время как в листьях арабидопсиса — до 3 %.

Различия в гликозилировании белков, синтезированных в клетках растений и млекопитающих, — главная проблема при использовании их в медицине. Гликопротеины, продуцированные в растениях, имеют две дополнительные углеводные детерминанты: β(1,2)-ксилозу и α(1,3)-фукозу. Было высказано предположение, что такие олигосахаридные остатки, не найденные в N-гликанах млекопитающих, могут оказаться аллергенными для человека: в крови экспериментальных животных обнаружены специфические IgE против растительных углеводных детерминант. Хотя это не может напрямую расцениваться как показатель аллергии, тем не менее лучше избегать возможных побочных эффектов при использовании рекомбинантных белков в клинической практике. Сравнение процессов синтеза N-гликанов в клетках растений и млекопитающих показало, что ключевым ферментом, способным превращать растительные N-гликаны в N-гликаны

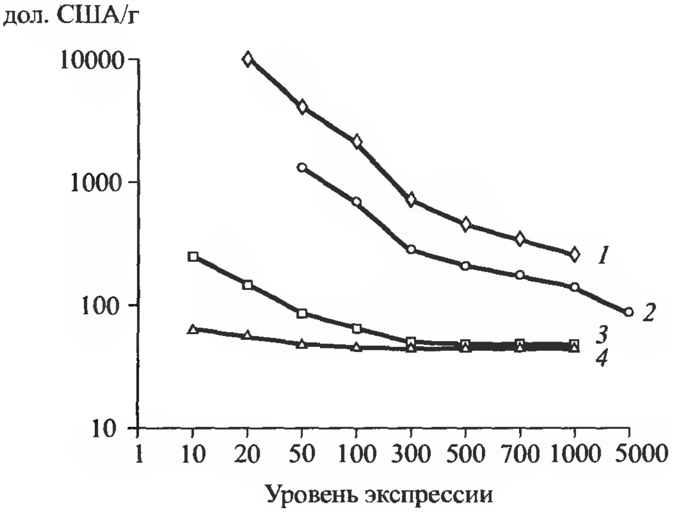


Рис. 19.9. Расчетная стоимость иммуноглобулина А, произведенного в разных системах экспрессии в зависимости от уровня его продукции:

1 — в культуре клеток млекопитающих, мг/л; *2* — в молоке трансгенных коз, мг/л; *3*, *4* — в трансгенных растениях, мг/кг (*3* — в семенах при продукции 7,5 т/га, *4* — в зеленой массе при продукции 120 т/га)

млекопитающих, является β(1,4)-галактозилтрансфераза. Х. Бэккер с соавторами в 2001 г. провели скрещивание трансгенных растений табака, экспрессирующих этот фермент, с растениями, продуцирующими одновременно тяжелую и легкую цепи иммуноглобулина. В потомстве, продуцирующем три чужеродных белка, до 30 % молекул иммуноглобулина содержали галактозилированные N-гликаны.

Полученные результаты позволяют надеяться, что в ближайшие годы большинство проблем с модификацией белков человека, синтезируемых в трансгенных растениях, будет решено и «растительные» антитела будут широко использоваться в клинике. Такому прогнозу должно способствовать и то, что, по произведенным оценкам, антитела, синтезированные в трансгенных растениях, заметно дешевле по сравнению с этими же антителами, произведенными в культуре клеток млекопитающих или молоке трансгенных животных (рис. 19.9).

19.6.2. Съедобные вакцины

Слизистые оболочки пищеварительной, респираторной и мочеполовой систем являются местом проникновения и колонизации многих патогенов. Защитные функции этих оболочек обеспечиваются в значительной степени наличием в них многочисленных иммунокомпетентных клеток, в том числе Т- и В-лимфоцитов, организованных в лимфоидные ткани. Многочисленные исследования показали, что индукция системного иммунного ответа в результате инъекционной иммунизации может эффективно предотвращать системные инфекции, но обычно при этом не защищает слизистые оболочки. Доставка антигена на слизистые чаще всего приводит к стимуляции как местного, так и системного иммунного ответа.

Иммунный ответ на уровне слизистых оболочек сопровождается продукцией секреторного иммуноглобулина IgA (sIgA), который обычно не синтезируется при системном иммунном ответе. Антигены попадают с поверхности слизистой в подлежащую лимфоидную ткань с помощью так называемых М-клеток. Там они процессируются и презентируются В- и Т-лимфоцитам антигенпрезентирующими клетками (такими, как субэпителиальные дендритные клетки и макрофаги). После сенсибилизации антигенами В-клетки пролиферируют и переключаются на синтез IgA. Затем В-клетки мигрируют к различным участкам слизистой и окончательно дифференцируются в sIgA-продуцирующие плазматические клетки. Секреторные иммуноглобулины предотвращают взаимодействие патогенов с поверхностными рецепторами клеток слизистых оболочек. Интересным является факт взаимосвязи иммунного ответа слизистых оболочек желудочно-кишечного, респираторного и мочеполового трактов. Так, если стимулировать иммунный ответ в кишечнике, то специфичный иммунный ответ против данного антигена в виде продукции соответствующего sIgA также будет наблюдаться в дыхательных и мочеполовых путях.

Таким образом, для эффективной защиты слизистых оболочек необходимо осуществлять их местную иммунизацию. Она имеет ряд преимуществ перед инъекционной иммунизацией,

так как может увеличивать эффективность вакцины, индуцируя одновременно местный и системный иммунитет. При этом упрощается введение вакцины (нанесение на слизистые) и снижается риск сопутствующего инфицирования по сравнению с другими методами (инъекции, скарификация).

В слизистых оболочках функционируют механизмы удаления антигенов с поверхностей, ферментативной деградации антигенов, снижения эффективности их проникновения в антигенпоглощающие М-клетки. Эти факторы усложняют доставку антигена при иммунизации через слизистые оболочки. Для защиты иммунизирующих антигенов их упаковывают в биодеградируемые полимерные или липидные частицы, которые вводят чаще всего орально или назально.

Новейший подход к созданию мукозных (от лат. mucosus — слизистый) вакцин состоит в получении трансгенных растений, продуцирующих протективные антигенные белки инфекционных агентов, и использовании их в качестве ***съедобных вакцин***. Стенки клеток растений обеспечивают эффективную защиту находящегося в них антигена в ротовой полости и в желудке, содержимое которого имеет кислую реакцию. Поэтому «упакованный» таким образом антиген эффективно достигает кишечника, где индуцирует иммунный ответ на уровне слизистых оболочек. Важной особенностью съедобных вакцин является их потенциальная дешевизна, биологическая безопасность (отсутствие в растениях патогенов человека и животных), простота хранения и применения. Более того, в будущем можно будет создать растения, продуцирующие одновременно несколько протективных антигенов различных патогенов. Это будут мультивалентные съедобные вакцины.

Концепцию производства вакцин в трансгенных растениях впервые сформулировали Х. Мэйсон с соавторами (1992 г.). Они предприняли попытку получения съедобной вакцины против вируса гепатита В на основе трансгенного табака. Были созданы растения, экспрессирующие поверхностный антиген вируса гепатита В. Рекомбинантный HBsAg выделили из трансгенных растений с помощью иммуноаффинной хроматографии и исследовали под электронным микроскопом. Оказалось, что рекомбинантный HBsAg способен собираться в вирусоподобные частицы размером около 22 нм и взаимодействовать с антителами, выделенными из крови лиц, инфицированных HBV. Вакцинация мышей инъекционным способом HBsAg антигеном, выделенным из трансгенных растений табака, стимулировала такой же специфичный иммунный ответ, как и коммерческая дрожжевая субъединичная вакцина. Это исследование показало возможность создания трансгенных растений для получения рекомбинантных вирусных белков, обладающих нормальной биологической активностью.

На следующем этапе был создан трансгенный картофель, продуцирующий HBsAg, и при скармливании мышам клубней такого картофеля наблюдали развитие специфичного иммунного ответа против вируса гепатита В. В 1999 г. были начаты эксперименты на добровольцах, и у людей, поедавших сырые клубни картофеля, также наблюдали специфичный противовирусный иммунный ответ.

Другая группа исследователей в 1999 г. создала съедобную вакцину против вируса гепатита В на основе люпина и салата. У мышей, которым скармливали люпин, наблюдалось появление антител к вирусу, а у добровольцев, получавших с пищей трансгенный салат, развивался специфический иммунный ответ на вирусный белок.

Х. Мэйсон с соавторами создали в 1996 г. трансгенные растения картофеля и табака, экспрессирующие белок нуклеокапсида вируса Норфолка, вызывающего у людей острый гастроэнтерит. Было показано, что чужеродный белок в растении формирует вирусоподобные частицы диаметром 38 нм, идентичные частицам, полученным в культуре клеток насекомых, инфицированных рекомбинантным бакуловирусом. При скармливании клубней трансгенного картофеля мышам у них стимулировалось образование специфического IgG, а при внутрижелудочном введении листьев трансгенного табака наблюдалось появление сывороточного IgG и секреторного IgA, специфичных к вирусоподобным частицам.

В 1995 г. были сконструированы трансгенные растения картофеля, синтезирующие олигомерный полипептид LT-B. LT — это термолабильный токсин *E. coli*, который состоит из шести субъединиц: фермента LT-A и пяти рецепторсвязывающих полипептидов LT-B. Субъединица LT-A проникает в эпителиальные клетки кишечника и вызывает изменения клеточного метаболизма, приводящие к потере воды клетками. LT-B формируют пентамер, который связывается с GM_1-ганглиозидами мембраны эпителиоцитов и обеспечивает транспорт LT-A в клетки. Субъединица LT-B может быть отделена от LT-A и при оральном введении вызыва-

Таблица 19.4. **Свойства некоторых съедобных вакцин, созданных на основе трансгенных растений**

Источник иммуногена	Экспрессируемый белок или пептид	Растительная система экспрессии	Максимальный уровень экспрессии, зарегистрированный в растениях	Чистота, иммуногенность и протективная емкость вакцины	Год опубликования
1	2	3	4	5	6
			Вакцины для человека		
Энтеротоксигенная *E. coli*	В-субъединица термолабильного токсина (LT-B)	Табак	< 0,01 % СРБ[1]	Формирует мультимеры, экстрагированный из растений белок иммуногенен при оральном введении	1995
	То же	Картофель	< 0,19 % СРБ	Формирует мультимеры, иммуногенен и протективен при оральном введении (поедании сырых клубней)	1995, 1998
	— « —	Кукуруза	Нет данных	Иммуногенен и протективен при оральном введении (поедании зерен)	2000
Холерный вибрион	В-субъединица холерного токсина (СТВ)	Картофель	< 0,30 % СРБ	Формирует мультимеры, иммуногенен и протективен при оральном введении (поедании сырых клубней)	1997, 1998
Вирус гепатита В	Поверхностный белок оболочки (HBsAg)	Табак	< 0,01 % СРБ	Формирует вирусоподобные частицы, после экстракции из растений иммуногенен при инъекционном введении	1992, 1995
	То же	Люпин	< 0,01 % СВ[2]	Иммуногенен при оральном введении (поедании листьев)	1999
	— « —	Салат	< 0,01 % СВ	Иммуногенен при оральном введении (поедании листьев)	1999
	— « —	Картофель	< 0,01 % СВ	Формирует вирусоподобные частицы, иммуногенен при оральном введении (поедании сырых клубней)	2001
Вирус Норфолк гастроэнтерита человека	Белок капсида (NVCP)	Табак	< 0,23 % СРБ	Формирует вирусоподобные частицы, иммуногенен при оральном введении экстракта листьев	1996
	То же	Картофель	< 0,37 % СРБ	Формирует вирусоподобные частицы, иммуногенен при оральном введении (поеданин сырых клубней)	1996, 2000
Цитомегаловирус человека	Гликопротеин В	Табак	< 0,02 % СРБ	Иммунохимически соответствует природному белку	1999
Вирус папилломы человека	Основной капсидный белок (L1)	Картофель	< 0,01 % СВ	Формирует вирусоподобные частицы, иммуногенен при оральном введении (поедании сырых клубней)	2003
Вирус кори	Гемагглютинин (MV-H)	Салат	Нет данных	Иммуногенен и протективен при оральном введении (поедании листьев)	2002
			Вакцина для кроликов		
Кроличий вирус геморрагического заболевания	Основной вирионный белок (VP60)	Картофель	< 0,30 % СРБ	Иммуногенен и протективен при оральном введении экстракта клубней	1999, 2003

Окончание табл. 19.4

1	2	3	4	5	6
			Вакцины для сельскохозяйственных животных		
Вирус ящура	Вирионный белок (VP1)	Арабидопсис	Нет данных	Иммуногенен и протективен при инъекционном введении	1998
	То же	Люцерна	Нет данных	Иммуногенен и протективен при инъекционном или оральном введении (поедании листьев)	1999
			Вакцины для свиней		
Трансмиссибельный гастроэнтеритный коронавирус свиней	Гликопротеин S	Арабидопсис	< 0,06 % СРБ	Иммуногенен при инъекционном введении экстракта листьев	1998
	То же	Табак	< 0,02 % СРБ	Иммуногенен при инъекционном введении	2000
	— « —	Кукуруза	< 0,01 % СВ	Протективен при оральном введении (поедании зерен)	2000

[1] СРБ — суммарный растворимый белок.
[2] СВ — сырой вес.

ет сильный иммунный ответ слизистой оболочки без каких-либо признаков болезни. Трансгенный картофель, продуцирующий LT-B, использовали в экспериментах на мышах. После четырех кормлений у животных начинал вырабатываться анти-LT-B IgG в сыворотке и IgA в слизистой кишечника. В опытах на добровольцах (1998 г.) было обнаружено появление в крови клеток, секретирующих специфические антитела. Эти клетки появляются в крови примерно на 7-й день после иммунизации (поедания трансгенного картофеля) и по прошествии 14 дней мигрируют в ткань слизистой. Присутствие их в крови с 7-го по 10-й день подтверждает важную роль иммунного ответа слизистой оболочки кишечника. Кроме того, у 91 % добровольцев наблюдалось четырехкратное повышение концентрации анти-LT IgG, а у 55 % — четырехкратное повышение концентрации анти-LT IgA. В более ранних исследованиях такой же эффект наблюдали при оральном введении определенного количества культуры вирулентной энтеротоксичной *E. coli*.

В 2001 г. другая группа ученых сконструировала синтетический ген LT-B, оптимизированный для экспрессии в клубнях картофеля. Введение этого гена под контролем тканеспецифичного промотора в геном картофеля привело к продукции функциональных рекомбинантных пентамеров LT-B в клубнях. При подкожной инъекции экстракт этих клубней вызывал у мышей гуморальный иммунный ответ, сравнимый с ответом на бактериальный LT-B. Эффективным оказалось также скармливание клубней или их внутрижелудочное введение: значительное увеличение содержания анти-LT-антител обнаруживали в сыворотке крови и фекалиях.

Группа С. Стретфилда (2001 г.) достигла высокого уровня экспрессии LT-B в кукурузе. Скармливание зерна, содержащего чужеродный белок, вызывало у мышей иммунный ответ.

Похожую работу выполнили Т. Аракава с соавторами (1998 г.), создав трансгенные растения картофеля, экспрессирующие B-субъединицу холерного токсина (CT-B). У мышей, получавших с пищей клубни или листья, наблюдалось образование специфических антител в сыворотке крови и в слизистой кишечника, а цитотоксический эффект холерного токсина на культуру клеток почки зеленой мартышки Vero нейтрализовался сывороткой крови иммунизированных мышей. Объем жидкости, накапливаемой в тонком кишечнике, у иммунизированных животных по сравнению с мышами, больными холерой, уменьшился на 60 %.

Из-за способности связываться с GM_1-ганглиозидами эпителиальных клеток кишечника CT-B может быть эффективной молекулой-носителем для различных полипептидов и индуцировать иммунитет слизистой оболочки. CT-B облегчает доставку антигена в лимфоидную ткань кишечника и его презентацию. В ряде экспериментов было показано, что оральное введение аутоантигенов предотвращает развитие аутоиммунных заболеваний, таких как диабет I типа, ревматоидный артрит или рассеян-

ный склероз. Т. Аракава с соавторами (1998 г.) показали, что экспрессируемый в картофеле химерный полипептид, состоящий из последовательности CT-B и присоединенной к ее C-концу последовательности человеческого инсулина, сохранял пентамерную структуру и способность связываться с GM_1-ганглиозидами, а также обладал иммуногенностью как инсулина, так и CT-B. У мышей, принимавших с пищей трансгенный картофель, наблюдалось образование анти-CT-B-антител и значительное замедление развития экспериментально индуцированного диабета.

Работы по созданию съедобных вакцин активно продолжаются. Результаты некоторых исследований приведены в табл. 19.4. Важным направлением развития данных исследований является создание съедобных вакцин на основе растений, которые могут широко использоваться в пищу без термообработки (томаты, бананы, салат и др.). По принятой в настоящее время концепции для увеличения эффективности съедобных вакцин необходимо решить проблему повышения уровня продукции целевых антигенов в трансгенных растениях, так как классический подход обеспечивает довольно низкую продуктивность. Большие надежды на решение этой проблемы связывают с разрабатываемыми системами экспрессии на основе вирусов растений и генетической трансформации хлоропластов.

19.7. ПЕРЕНОС ГЕНОВ В РАСТЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ ВИРУСОВ

Подавляющее большинство вирусов растений являются вирусами с одноцепочечной РНК и реплицируются в цитоплазме клетки. Вирусы в растениях накапливаются до высоких концентраций, поэтому заманчиво использовать их в качестве многокопийных экспрессирующих векторов. При этом генно-инженерные манипуляции по встройке целевых последовательностей в вирусный геном осуществляют на клонированных в бактериальных плазмидах ДНК-копиях вирусных РНК. ДНК-копию в плазмиде встраивают между промотором и терминатором транскрипции фага (например T7). С помощью фаговой РНК-полимеразы *in vitro* синтезируют РНК-транскрипты гибридных ДНК и трансфицируют ими протопласты или ткани растения.

Высокий уровень экспрессии встроенного гена, быстрая аккумуляция значительных количеств чужеродного белка и вследствие этого простота его очистки делают вирусы растений привлекательными векторами для переноса генов. Вирусы растений имеют более широкий круг хозяев, чем агробактерии, что позволяет экспрессировать ген в разных видах растений с помощью одной и той же векторной конструкции. Кроме того, если антиген многократно экспонирован на поверхности вирусных частиц, его иммуногенность существенно повышается. В качестве носителей для антигенных пептидов используют белки оболочки вирусов табачной мозаики, мозаики коровьего гороха, мозаики вигны китайской, мозаики люцерны и некоторых других вирусов.

Наиболее хорошо изучены вирусы табачной мозаики и мозаики коровьего гороха.

Вирус табачной мозаики (TMV) — наиболее привлекательный кандидат для разработки на его основе экспрессионной системы растений. Данный вирус имеет относительно широкий круг чувствительных к нему видов растений. В растениях табака он накапливается в огромных количествах, и содержание вирусных частиц достигает 60 мг/г сырого веса листьев.

Вирусная одноцепочечная РНК имеет размер 6,4 тыс. нуклеотидов и кодирует четыре белка (рис. 19.10, *а*). При этом белок распространения (movement protein, MP) вирионов по растению и белок оболочки вирионов (coat protein, CP) синтезируются с субгеномных молекул РНК, транскрипция которых направляется с соответствующих субгеномных промоторов. Интересен механизм синтеза двух полипептидов (126 кДа и 183 кДа) РНК-зависимой РНК-полимеразы. Трансляция полипептида 126K терминируется на стоп-кодоне UAG. Однако часть рибосом прочитывает этот терминирующий кодон с помощью тирозиновой тРНК и продолжает синтез белка 183K. Оказалось, что для такого прочтения необходима определенная последовательность нуклеотидов в 3′-положении относительно стоп-кодона (CAA–UUA), которая обеспечивает его «протекаемость» (leakiness).

В вирусных частицах одна полноразмерная молекула РНК «одевается» 2130 молекулами белка оболочки (см. рис. 19.10, *б*), и образуются палочковидные вирионы длиной 300 нм. Структура белка оболочки TMV была подробно изучена, что позволило планировать и осуществлять эксперименты по встройке в его состав чужеродных последовательностей.

Первую попытку экспрессировать чужеродный пептид на поверхности вирионов TMV осуществили Н. Такаматсу с соавторами в 1990 г. Кодирующую последовательность пентапепти-

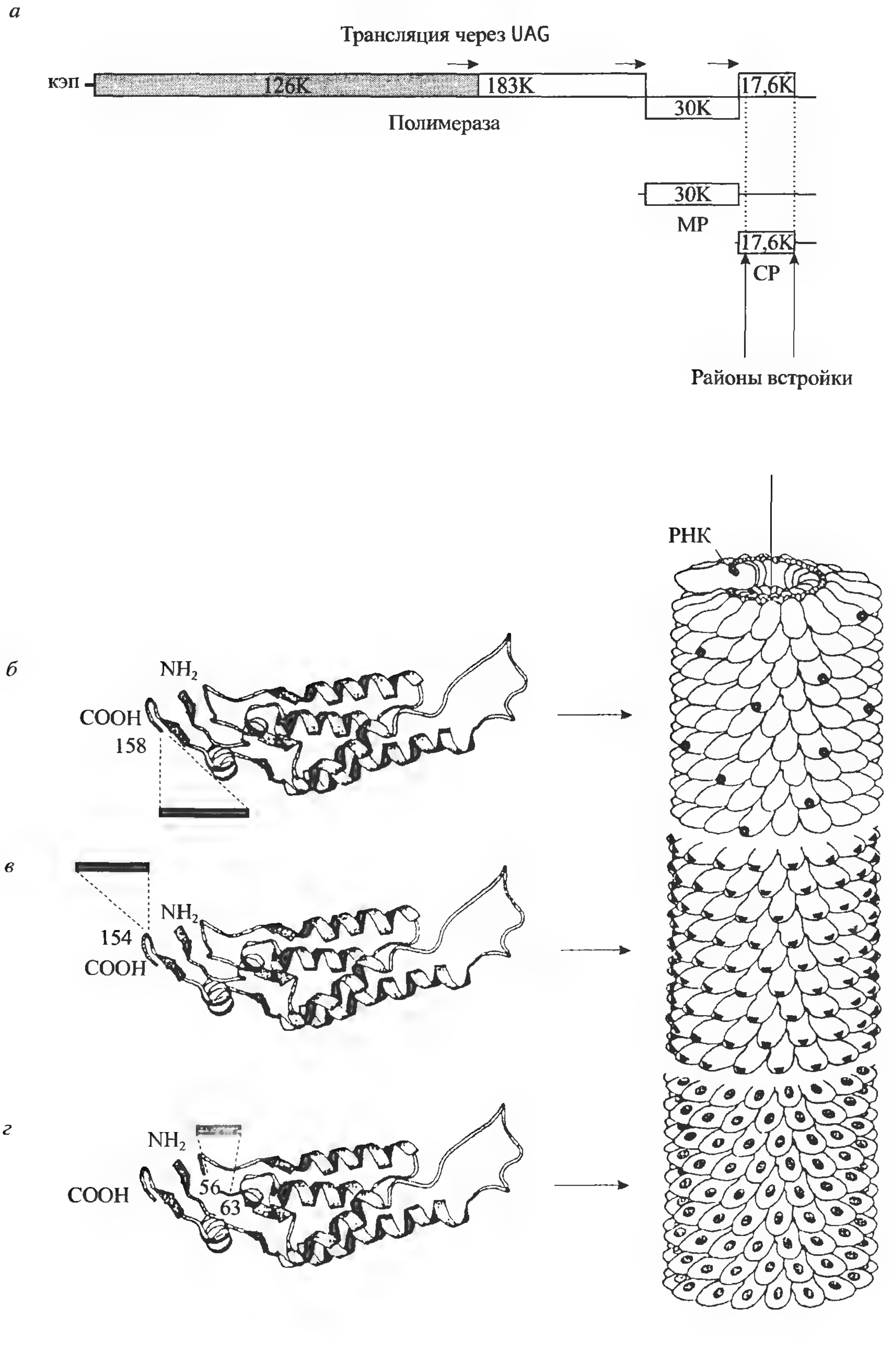


Рис. 19.10. Структура геномной РНК и субгеномных молекул РНК вируса табачной мозаики (*а*) и стратегии встройки чужеродных аминокислотных последовательностей в состав белка оболочки TMV (*б–г*)

Рис. 19.11. Схема участка плазмиды TMV-30B.VP1, содержащего ДНК-копию полного генома TMV и ген основного иммуногенного белка VP1 вируса ящура.

Ген *VP1* встроен сразу за субгеномным промотором (белая стрелка) оболочечного белка (CP). Транскрипция оболочечного белка осуществляется с экзогенного субгеномного промотора близкородственного тобамовируса (заштрихованная стрелка). Черная стрелка — субгеномный промотор гена белка MP. Плазмиду TMV-30B.VP1 переводили в линейную форму, гидролизуя рестриктазой *Kpn*I по единственному участку узнавания, с промотора фага T7 *in vitro* синтезировали РНК-транскрипты, которые инокулировали в листья табака для получения вирусного потомства

да лей-энкефалина (Enk), обладающего опиатной активностью, встроили в ген белка оболочки непосредственно перед терминаторным триплетом. После трансфекции полученным РНК-транскриптом протопластов табака наблюдали в них синтез химерного белка CP–Enk, но выход его был в три раза меньше по сравнению с CP дикого типа в тех же условиях. Оказалось, что встройка в С-конец белка оболочки нарушает процесс сборки полноценных вирусных частиц.

Данную проблему решили в 1993 г. Х. Хамамото с соавторами, которые предложили использовать природную стратегию синтеза двух полипептидов РНК-полимеразы вируса табачной мозаики. Авторы создали векторную конструкцию, в которой после стоп-кодона гена CP ввели последовательность из шести нуклеотидов, обеспечивающую прочтение этого кодона как значащего. Далее в совпадающей рамке трансляции встроили последовательность, кодирующую пептид длиной 12 АК — ингибитор фермента, конвертирующего ангиотензин-I. При введении гибридной РНК TMV в клетки растений наблюдался синтез как немодифицированного CP, так и его химерной формы. После сборки вирусные частицы содержали в своем составе около 5 % химерных молекул CP (см. рис. 19.10, *б*). Продуктивность в листьях табака или томатов в пересчете на химерный белок при этом достигала 100 мкг/г сырого веса.

По разработанной стратегии получили варианты TMV, на поверхности которых были представлены иммуногенные эпитопы вирусов гриппа, иммунодефицита человека типа 1 или малярийного плазмодия. Т. Турпен с соавторами (1995 г.) обнаружили, что встройка чужеродной последовательности в район поверхностной петли CP, а не к его С-концу, обеспечивает сборку полноценных вирусных частиц, на поверхности каждой из белковых молекул которых представлен встроенный пептид (см. рис. 19.10, *в*). При использовании такого вируса для иммунизации животных наблюдался значительно более эффективный иммунный ответ на целевой полипептид. В том же году Дж. Фитчен с соавторами продемонстрировали возможность встройки чужеродного полипептида в другой участок CP TMV (см. рис. 19.10, *г*). Встройка пептида длиной 13 АК из состава гликопротеина S вируса гепатита мыши позволила получить гибридный TMV. Интраназальное введение мышам гомогената листьев табака, инфицированного данным вирусом, приводило к развитию у этих животных протективного иммунного ответа против вируса гепатита.

А. Вигдоровиц с соавторами (1999 г.) расширили возможности использования TMV для продукции субъединичных вакцин. Они создали вектор на основе ДНК-копии РНК TMV, обеспечивающий синтез индивидуальных чужеродных белков в большом количестве. Авторы встроили полилинкер сразу после субгеномного промотора гена CP (рис. 19.11) для встройки и экспрессии под его контролем чужеродных генов. Для обеспечения нормальной продукции вирусного белка CP после полилинкера поместили второй гомологичный субгеномный промотор, выделенный из генома другого штамма

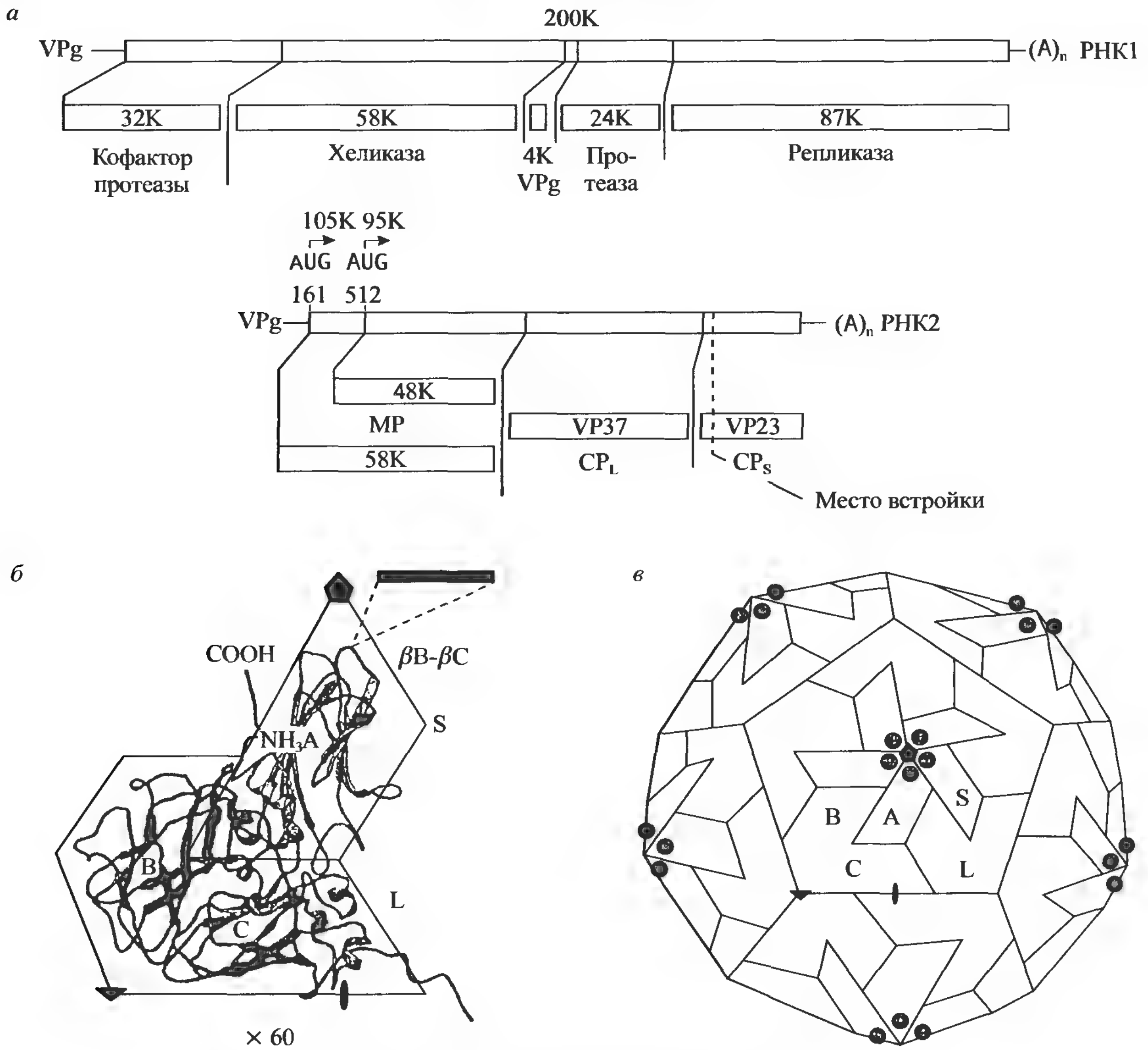


Рис. 19.12. Структура генома вируса мозаики коровьего гороха (*а*) и схема встройки чужеродных полипептидов в состав белка VP23 (*б*), который в комплексе с VP37 формирует капсид (*в*)

TMV. Созданная конструкция была стабильна в растениях и обеспечивала эффективный синтез полноразмерного белка VP1 (главный иммуногенный белок) вируса ящура. Экстракты листьев табака, введенные мышам инъекционно, обеспечивали развитие иммунного ответа и защиту животных от заражения 10^4 летальных доз вирулентного штамма вируса ящура.

Вирус мозаики коровьего гороха (CPMV) инфицирует бобовые растения, его природным хозяином является коровий горох *Vigna unguiculata*, в котором он накапливается до 1–2 мг/г сырого веса листьев. Геном CPMV состоит из двух одноцепочечных молекул РНК размером 5,9 тыс. нуклеотидов (РНК1) и 3,5 тыс. нуклеотидов (РНК2) (рис. 19.12, *а*). Каждая из этих РНК кодирует по одному полипротеину-предшественнику, из которых в результате специфичного процессинга образуются зрелые белки. Кодируемые РНК1 белки обеспечивают функции репликации и протеолитического процессинга полипротеинов, а РНК2 кодирует белки, необходимые для сборки капсида и распространения вирионов по растению. Икосаэдрический капсид CPMV состоит из двух белков — L (37 кДа) и S (23 кДа), каждый из которых представлен 60 копиями (см. рис. 19.12, *в*). Организация этих белков в капсиде вируса изучена очень подробно, что позволило встраивать чужеродные последовательности без нарушения сборки вирионов и их распространения в растениях.

Петля βB-βC белка S (см. рис. 19.12, *б*) находится на поверхности вириона и наиболее ва-

риабельна по аминокислотной последовательности в разных штаммах CPMV. Логично было предположить, что изменения последовательности в этом районе белка S допустимы. Г. Ломоноcофф с соавторам (1993–2000 гг.) выполнили серию работ по встройке в район петли βB-βC последовательностей иммунодоминантных доменов белков VP1 вируса ящура, gp41 вируса иммунодефицита человека типа 1, VP1 риновируса человека 14 и VP2 вируса энтерита норок. В эксперименте химерные вирионы показали высокую иммуногенность, вызывая у лабораторных животных образование антител против встроенных пептидов вирусов животных и человека.

Схожие работы выполняются и на других вирусах растений. Например, А. Моделска с соавторами в 1998 г. показали, что оральная иммунизация мышей листьями шпината, инфицированного вирусом мозаики люцерны, на поверхности частиц которого были экспонированы два эпитопа иммуногенного белка вируса бешенства, привела к стимуляции синтеза специфичных IgG и IgA. Около 40 % животных оказались устойчивыми к инфицированию летальной дозой вируса бешенства.

Как видим, векторная система вирусов растений имеет определенные преимущества перед трансгенными растениями. Однако при создании вирусов, экспонирующих на поверхности своих частиц чужеродные пептиды, существует ограничение на размер такого пептида. Максимальный размер встройки, при котором процесс сборки вирусных частиц еще не нарушается, для вируса табачной мозаики составляет 25 АК, а для вируса мозаики люцерны — 37 АК. Кроме того, вирусная система не обеспечивает наследования растениями экзогенной РНК: продукция вируса и экспрессия встроенного целевого гена возможна только в инфицированных растениях в ограниченный промежуток времени. Главным недостатком вирусной системы экспрессии в растениях является опасность распространения этих вирусов в окружающей среде насекомыми, механическими (контактными) и другими способами. Поэтому требуются жесткие меры контроля за инфицированными растениями.

19.8. ТРАНСГЕННАЯ СИСТЕМА ХЛОРОПЛАСТОВ

Многочисленные белки человеческой крови важны для создания терапевтических препаратов. Поэтому большое внимание уделяется созданию трансгенных растений, продуцирующих такие белки. Однако, как уже отмечалось, трансгенные растения с интеграцией целевого гена в хромосомы ядра обычно обеспечивают низкий уровень синтеза чужеродного белка (см. табл. 19.4). Существенного повышения продуктивности растений по чужеродному белку можно добиться увеличением дозы гена, однако в хромосомной ДНК множественные повторы нестабильны. Преодолеть это затруднение удается при использовании трансгенной системы хлоропластов (пластид).

Пластиды находятся в большом количестве в разных органах и тканях растений. Геном пластид — ***пластома*** — кольцевая молекула двухцепочечной ДНК размером 120–180 тпн. Пластиды полиплоидны и каждая несет от 10 до 100 пластом. Единичная клетка зрелого листа может содержать до 100 пластид, а следовательно, до 10 тыс. пластидных геномов. Хотя в растении в каждой клетке пластидные геномы идентичны, данные органеллы могут значительно различаться по морфологии и функциям. Так, листья и зеленые ткани содержат фотосинтезирующие хлоропласты, зрелые фрукты и цветы — пигментированные хромопласты, клубни и другие запасающие органы — амилопласты или элайопласты, а другие незеленые ткани, включая корни, — лейкопласты.

Принципиальную возможность введения и стабильной интеграции экзогенной ДНК в пластидный геном продемонстрировали Дж. Бойнтон с соавторами в 1988 г. на примере одноклеточной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. В 1990 г. З. Сваб, П. Хайдукевич и П. Малига описали первую стабильную трансформацию пластид высших растений. Листья табака *Nicotiana tabacum* обстреливали микрочастицами вольфрама, на поверхности которых была адсорбирована ДНК гибридной плазмиды pZS148 (рис. 19.13). Данная плазмида была получена встройкой в клонирующий вектор *E. coli* pBluescript фрагмента пластидной ДНК мутантной линии табака, высокоустойчивой к антибиотикам спектиномицину и стрептомицину за счет мутаций в гене *rrn*16 16S рибосомной РНК. Предполагалось, что гибридная плазмида проникнет в хлоропласты и произойдет встройка мутантного фрагмента пластидной ДНК за счет рекомбинации по областям гомологии. Такие растения, содержащие трансгенные пластомы, предложили называть ***транспластомными*** (transplastomic). Транспластомные линии от-

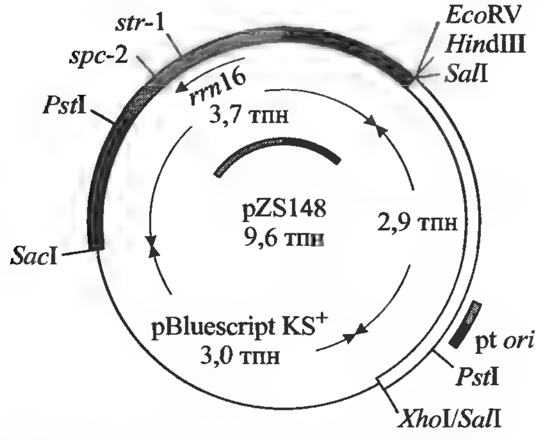


Рис. 19.13. Вектор пластидной трансформации pZS148.

Вектор состоит из последовательности плазмиды pBluescript, *SacI–EcoRV* фрагмента пластидной ДНК, содержащей ген *rrn*16 16S рибосомной РНК, и фрагмента пластидной ДНК с областью начала репликации (pt *ori*). *str*-1, *spc*-2 — мутации в гене *rrn*16, обусловливающие устойчивость к стрептомицину и спектомицину соответственно

бирали по нелетальному маркеру устойчивости к спектиномицину. На селективной среде устойчивые клоны имеют зеленую окраску, в то время как чувствительные клоны — белую. Когда клетки растут на такой селективной среде, сохраняются лишь пластиды, несущие гены устойчивости к спектиномицину, а пластиды дикого типа элиминируются. Пластидная трансформация происходит редко, поэтому полагают, что получаемые в результате селекции стабильные транспластомные клоны растения содержат в пластидах идентичные рекомбинантные пластомы. В первой работе из 148 обстрелянных образцов листьев табака удалось отобрать лишь 3 транспластомных клона.

В 1993 г. З. Сваб и П. Малига в качестве селективного маркера использовали бактериальный ген *aad*A (кодирует аминогликозид-3′-аденилилтрансферазу, инактивирующую спектиномицин и стрептомицин аденилированием), встроенный в гибридной плазмиде в межгенную область сегмента пластидной ДНК (рис. 19.14). В этом случае выход транспластомных клонов составлял 0,5–5 проростков на обстрелянный образец листа табака. В большинстве последующих работ в качестве селективного использовали именно этот ген.

В 2002 г. Ф. Хуанг с соавторами описали успешное использование кодирующей последовательности гена *aph*A-6 аминогликозидфосфотрансферазы из *Acinetobacter baumannii*, находящейся под контролем промотора гена *rrn*16, для отбора транспластомных растений табака на среде с канамицином.

Векторы пластидной трансформации представляют собой гибридные плазмиды *E. coli*, содержащие селективный и целевой для расте-

```
1                                                    cpt1
GCTCCCCCGC CGTCGTTCAA TGAGAATGGA TAAGAGGCTC GTGGGATTGA
51                       cpt2
CGTGAGGGGG CAGGGATGGC TATATTTCTG GGAGCGAACT CCGGGCGAAT
101                                  RBS
ACGAAGCGCT TGGATACAGT TGTAGGGAGG GATTTATGGC AGAAGCGGTG
```

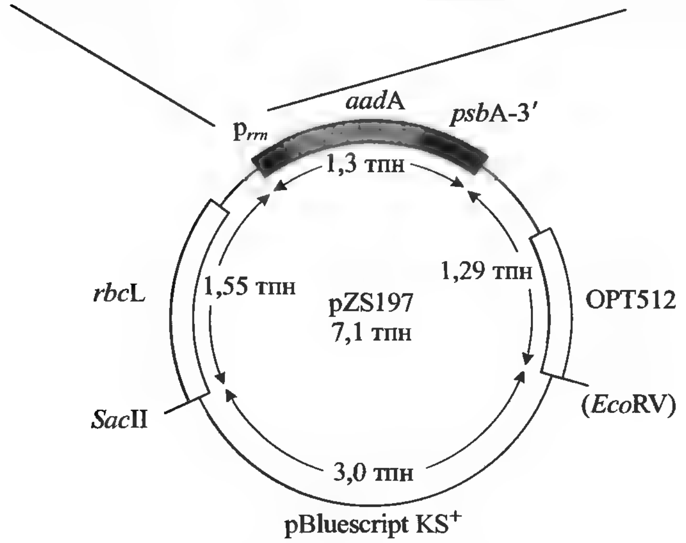


Рис. 19.14. Вектор пластидной трансформации pZS197.

Кодирующая последовательность гена *aad*A встроена во фрагмент пластидной ДНК между геном *rbc*L и OPT512 под контроль промотора рибосомного оперона пластид P_{rrn} (вверху приведена нуклеотидная последовательность) и ограничена 3′-концевой последовательностью пластидного гена *psb*A. cpt1, cpt2 — регуляторные области промотора

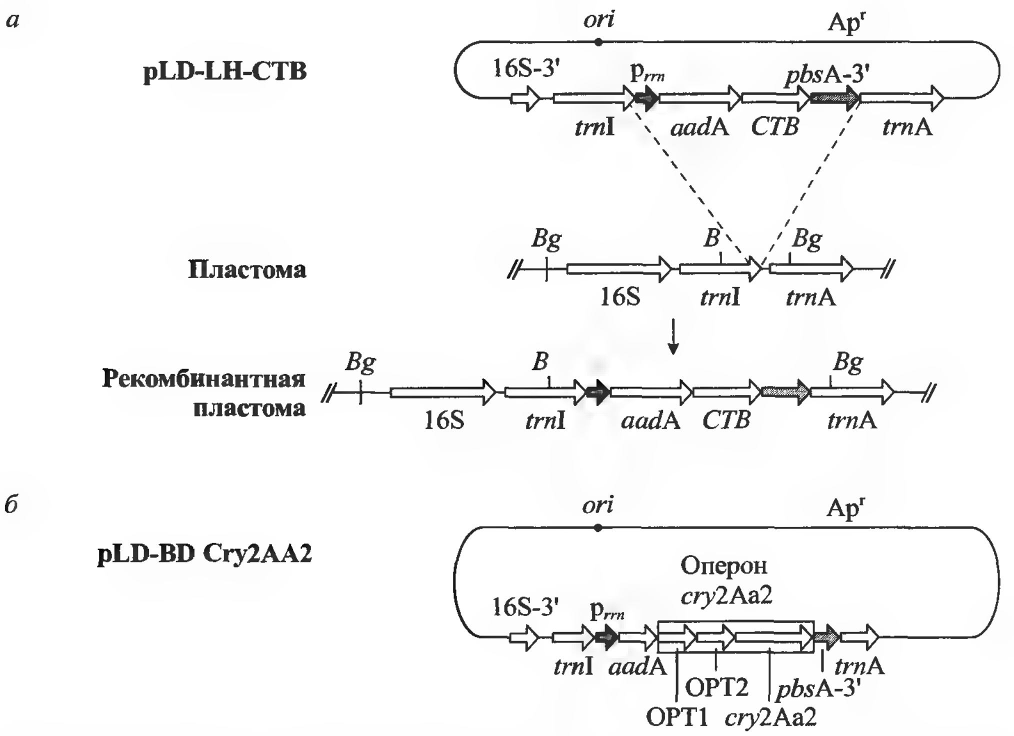


Рис. 19.15. Гибридные плазмиды пластидной трансформации для направленной встройки гена субъединицы В холерного токсина (*а*) и оперона *cry*2Аа2 токсина Bt (*б*) в пластому.
Сайты гидролиза рестриктазами: *B* — *Bam*HI, *Bg* — *Bgl*II

ний гены, фланкированные сегментами пластомной ДНК (рис. 19.15). Фланкирующие последовательности не обладают какими-либо специальными свойствами, они имеют размер 1–2 тпн и гомологичны выбранному району пластомы. Обычно встройку чужеродных генов осуществляют в межгенные участки ДНК пластид. Уже успешно опробовано около двух десятков таких мест встройки. Важным отличием транспластомных растений от классических трансгенных является то, что при пластидной трансформации получают клоны со встройкой трансгена в одно и то же место пластидной ДНК, т. е. идентичные. При встройке в ядерные хромосомы в результате агробактериальной трансформации все клоны отличаются друг от друга по месту встройки трансгена.

Для экспрессии трансгена чаще всего используют сильный пластидный промотор гена *rrn*16 (p_{rrn}). Транскрибируемая трансгенная РНК для эффективной трансляции на рибосомах пластид должна содержать на 5′-конце соответствующий участок связывания рибосом. Наряду с RBS некоторых пластидных генов хорошо себя зарекомендовала аналогичная последовательность гена *10* фага Т7. Некодирующий 3′-концевой район гена *psb*A компонента реакционного центра фотосистемы II хлоропластов стабилизирует транскрипты чужеродных генов, поэтому его обычно помещают в 3′-концевую часть трасгена, создаваемого для встройки в пластиды (см. рис. 19.15). Используют и другие 3′-концевые последовательности пластидных генов.

Выполненные в разных лабораториях эксперименты показали, что транспластомные растения табака могут обеспечить продукцию целевого чужеродного белка на уровне 1–25 % суммарного растворимого белка растения, а в некоторых случаях даже больше.

Важной особенностью пластид является возможность экспрессии в них оперонов и трансляции белков с полицистронных мРНК, что характерно для прокариот, но не реализуется у эукариот (в том числе в ядре клеток растений).

Рассмотрим примеры успешной экспрессии чужеродных генов в транспластомных растениях табака. В 2001 г. Х. Даниэл с сотрудниками создали векторную конструкцию (см. рис. 19.15, *а*), в которой между фланкирующими пластидными генами табака *trn*I и *trn*A под контроль промотора p_{rrn} тандемно встроили кодирующие последовательности генов *aad*A (селективный маркер) и *CTB* (ген субъединицы В холерного токсина, см. 19.7.2). Перед каждой кодирующей последовательностью ввели синтетические участки связывания рибосом, а для стабилизации чужеродного транскрипта

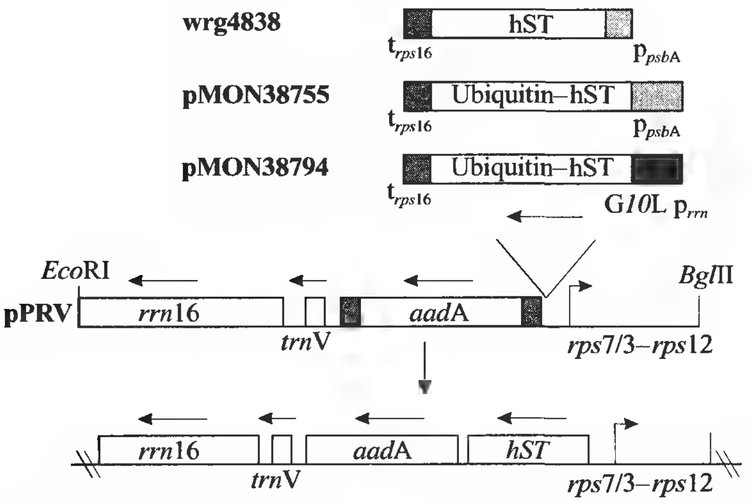


Рис. 19.16. Схема интеграции в хлоропластную ДНК гибридных конструкций, экспрессирующих соматотропин человека (hST)

в 3′-концевой части конструкции поместили нетранслируемую 3′-концевую область гена *psb*A. После рекомбинационной встройки селектировали транспластомные растения и изучали продукцию в них целевого белка СТ-В. Оказалось, что он эффективно синтезировался в растениях, собирался в функциональные олигомеры и был антигенно идентичен очищенному природному СТ-В. Данный чужеродный белок накапливался в листьях табака до уровня 4,1 % суммарного растворимого белка, что в 400 раз больше продуктивности, достигнутой при интеграции трансгена в ядерный геном этих растений.

Вследствие большой практической значимости растений, устойчивых к вредным насекомым, в ряде лабораторий были проведены работы по созданию трансгенных растений, продуцирующих инсектицидный токсин Bt *Bacillus thuringiensis* (см. 19.11). Синтез и процессинг белка Bt в бактерии контролируется трехгенным опероном *cry*2Aa2 (см. рис. 19.15, *б*). В данном опероне ген *cry*2Aa2, направляющий синтез белка Bt, расположен дистально. Ему предшествуют ОРТ1 и ОРТ2, кодирующие шаперон, который сворачивает белок Bt так, что он формирует протеолитически стабильные кубические кристаллы.

В классических трансгенных растениях со встройкой в ядро клетки с одной генетической конструкции может экспрессироваться лишь один ген. Полученные таким способом растения экспрессировали индивидуальный ген *cry*2Aa2. При этом белок Bt синтезировался в небольшом количестве даже после перекодировки бактериального гена под часто встречающиеся в генах растения триплеты. Более того, оказалось, что уровень продукции белка Bt в трансгенных растениях уменьшается на поздних этапах вегетации и в условиях физиологического стресса, что снижает устойчивость таких растений к вредным насекомым. Повысить уровень продукции инсектицидного токсина можно путем создания транспластомных растений, так как при этом достигается высокая доза интегрируемого гена. В лаборатории П. Малига (1995 г.) были получены транспластомные растения табака, экспрессирующие в хлоропластах индивидуальный ген *cry*2Aa2. В таких растениях токсин Bt накапливался уже в количестве 3–5 % суммарного растворимого белка листьев.

В лаборатории Х. Даниэла (2001 г.) в хлоропласты табака ввели полный трехгенный оперон *cry*2Aa2 *B. thuringiensis*. Под контроль промотора p_{rrn} были встроены последовательности гена *aad*A и оперона *cry*2Aa2 (см. рис. 19.15, *б*). Накопление бактериального белка в листьях транспластомного табака, экспрессирующего бактериальный оперон (без перекодировки), достигало 45,3 % (!) суммарного растворимого белка. Это наибольший уровень продукции чужеродного белка, выявлявшийся в растениях до сих пор. Стабильная высокая продукция токсина Bt в хлоропластах растения приводит к увеличению токсичности трансгенных растений для вредных насекомых и может предотвратить развитие среди них устойчивости к Bt.

Первую работу, в которой удалось добиться высокой продукции человеческого белка в транспластомных растениях, выполнили Дж. Стауб с соавторами в 2000 г. Хлоропласты табака трансформировали тремя гибридными конструкциями (рис. 19.16), экспрессирующими соматотропин человека (hST), являющийся

терапевтически важным белком. В плазмидах wrg4838 и pMON38755 синтетическая кодирующая последовательность hST, оптимизированная для экспрессии в бактериях, соединена с промотором и 5′-концевым некодирующим районом пластидного гена *psbA*, а в плазмиде pMON38794 — с промотором p_{rrn} и 5′-концевой некодирующей областью гена *10* фага T7 (G*10*L). Все гибридные конструкции содержали 3′-концевой элемент гена *rps*16 белка малой субъединицы рибосом хлоропластов, стабилизирующий мРНК (см. рис. 19.16). В плазмидах pMON38755 и pMON38794 кодирующая последовательность hST была слита в правильной рамке трансляции с последовательностью, кодирующей убиквитин. Слитые белки убиквитина расщепляются специфичной протеазой сразу после С-концевого остатка глицина в убиквитине. Это свойство позволяет получать рекомбинантные белки без метионинового остатка на N-конце. Сравнительный анализ продукции hST в трансгенных растениях табака показал, что трансформация хлоропластов приводит к многократному увеличению синтеза чужеродного белка (табл. 19.5). Кроме того, на уровень продукции hST в транспластомных растениях существенное влияние может оказывать структура 5′-концевой некодирующей области трансгена.

Таблица 19.5. **Продукция соматостатина человека в трансгенных растениях**

Плазмида	Локализация трансгена	Продукция hGH, % от суммарного растворимого белка
wrg4776	Ядро клетки	0,004–0,008
wrg4838	Хлоропласты	0,2
pMON38755	Хлоропласты	1,0
pMON38794	Хлоропласты	7,0

Таким образом, трансгенная система хлоропластов позволяет достичь высокой дозы чужеродного гена, что при правильно сконструированном трансгене обеспечивает очень эффективную продукцию целевого белка. Более того, способность пластид осуществлять экспрессию оперонов позволяет создавать искусственные опероны (см. рис. 19.15) и в перспективе — вводить новые метаболические пути в растения, улучшая их потребительские свойства. Важной особенностью пластид является то, что они передаются по материнской линии и обычно не содержатся в пыльце. Поэтому транспластомные растения по сравнению с обычными трансгенными растениями более безопасны для окружающей среды, так как в них предотвращается неконтролируемое распространение трансгена в другие растения. Поскольку интеграция в пластому происходит в результате гомологичной рекомбинации, отобранные клоны одинаковы и в них отсутствует эффект положения гена, характерный для случайной встройки трансгена при ядерной трансформации растений. В пластидах не наблюдается сайленсинг трансгена, поэтому его экспрессия стабильно сохраняется в последующих поколениях.

Наиболее просто удается осуществлять трансформацию хлоропластов и отбор траспластомных клонов у табака. Поэтому бóльшая часть исследований пока выполнена на этом растении. Однако по мере расширения круга лабораторий, вовлеченных в развитие очень перспективного направления создания транспластомных растений, стала возможной трансформация пластид резушки *Arabidopsis thaliana* (С. Сикдар и др., 1998 г.), картофеля *Solanum tuberosum* (В. Сидоров и др., 1999 г.), томатов *Lycopersicon esculentum* (С. Руф и др., 2001 г.) и масличной репы *Brassica napus* (Б. Хоу и др., 2003 г.). Использование данной методологии на других важных сельскохозяйственных культурах обеспечит значительный прогресс в создании растений – продуцентов различных белков медицинского и биотехнологического применения. При этом растения или их плоды, которые можно использовать в пищу без термообработки, наиболее перспективны для создания съедобных вакцин. Так, в первой работе по получению транспластомных растений томата С. Руф с соавторами (2001 г.) показали, что в хромопластах плодов томата трансген способен эффективно экспрессироваться, хотя при этом выход целевого белка был в два раза меньше по сравнению с его продукцией в хлоропластах листьев тех же растений.

19.9. БЕЛКОВЫЙ СПЛАЙСИНГ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ

В начале 1990-х гг. разными авторами было показано, что некоторые прокариотические и эукариотические гены содержат вставки в кодирующей последовательности в правильной рамке трансляции, которые выщепляются из белка, а не РНК. Данный процесс назвали ***белковым сплайсингом***. В первых работах обнаружили, что исходно синтезируется единый белок-предшественник, из которого затем выщепляется внутренняя последовательность, а флан-

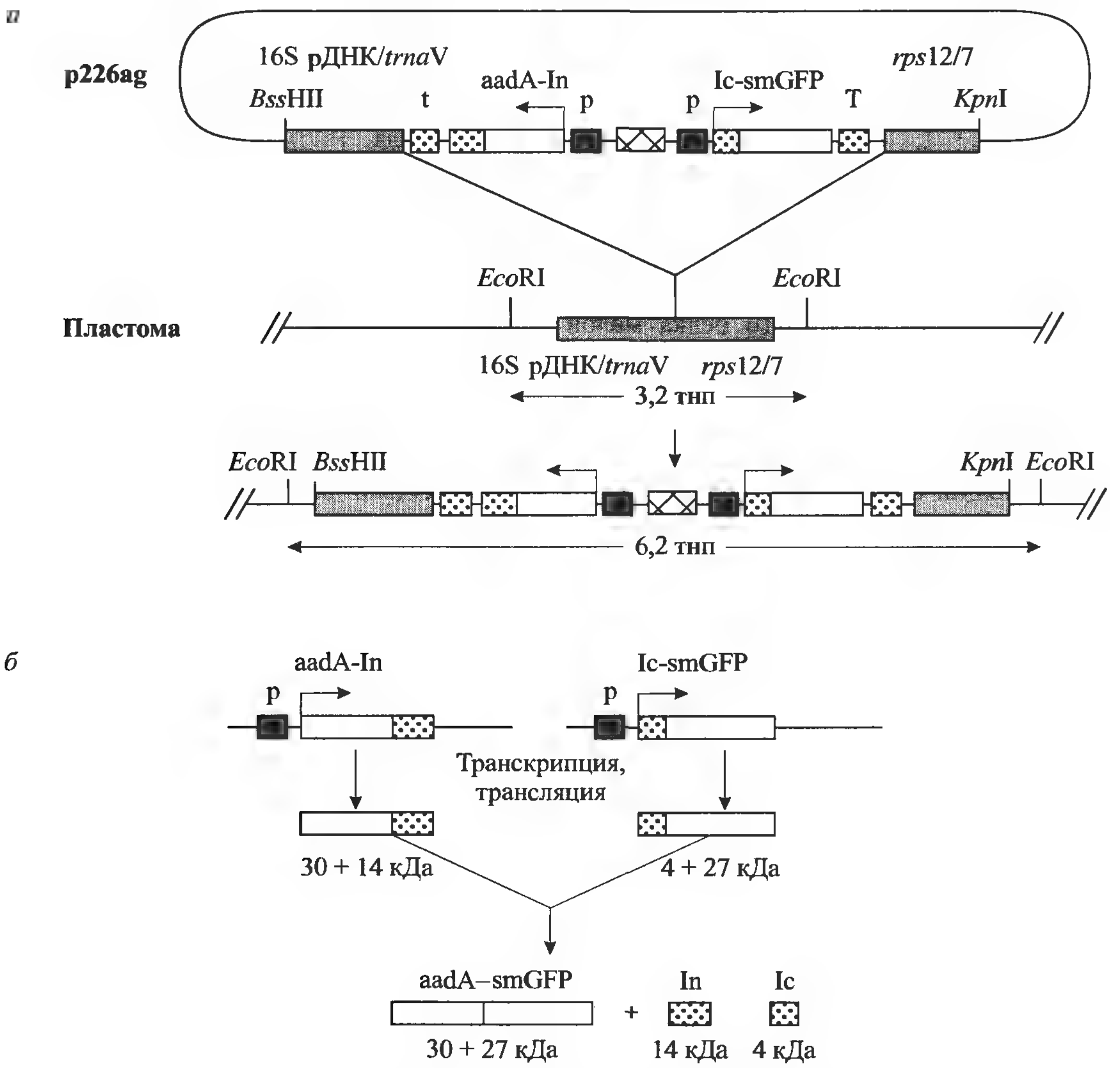


Рис. 19.17. Схема интеграции кассеты генов в ДНК хлоропластов (*а*) и транс-сплайсинга химерных белков (*б*)

кирующие последовательности ковалентно воссоединяются. Ф. Перлер с соавторами в 1994 г. предложили такие вставки в белке-предшественнике называть ***интеинами*** (от англ. *in*ternal pro*tein*), а воссоединяющиеся фланкирующие части белка — ***экстеинами*** (от англ. *ex*ternal pro*tein*). Уже выявлено более 100 интеинов, и наряду с классическим сплайсингом белка обнаружены примеры ***белкового транс-сплайсинга***. Так, в цианобактерии *Synechocystis* sp. белок DnaE (каталитическая α-субъединица ДНК-полимеразы III) кодируется расщепленным геном *dna*E, одна часть которого отделена от другой протяженным (745 тпн!) сегментом геномной ДНК. Ген *dna*E-n кодирует первые 774 АК DnaE, а ген *dna*E-c — остальные 423 АК этого белка. Два фрагмента гена транскрибируются с противоположных цепей геномной ДНК. После трансляции мРНК образуются N-концевой полипептид, состоящий из N-экстеина и слитого с ним фрагмента интеина (In, 123 АК), а также С-концевой полипептид, состоящий из другой порции интеина (Ic, 36 АК) и С-экстеина DnaE. Фрагменты интеина этих полипептидов объединяются, обусловливая белковый транс-сплайсинг, в процессе которого выщепляется интеин и сшиваются экстеины, образуя зрелую каталитически активную α-субъединицу ДНК-полимеразы III. Интеин в данном случае называют расщепленным (split intein).

Оказалось, что расщепленный интеин белка DnaE можно использовать *in vivo* (в клетках *E. coli*) для направленного процессинга других полипептидов, объединенных с последовательностями In и Ic. Это свойство расщепленного интеина использовали Х. Чин с соавторами (2003 г.) для реконструирования в трансгенных растениях функционально активных белков из раздельно синтезируемых фрагментов. На первом этапе сконструировали гибридную плазмиду интегра-

ции в пластидный геном p226ag, в которой разнонаправленно с промоторов гена *psb*A транскрибировались последовательности химерных белков aadA–In и Ic–smGFP (рис. 19.17). Поскольку промотор гена *psb*A функционально активен и в клетках *E. coli*, в этих бактериях проверили возможность транс-сплайсинга химерных белков. Вестерн-блот анализом было показано образование в трансформированных клетках *E. coli* белка размером 57 кДа, взаимодействующего с моноклональными антителами как против aadA, так и против smGFP (зеленый флюоресцирующий белок медузы *Aequoria victoria*, ген которого модифицирован для эффективной экспрессии в растениях и продукции данного белка в растворимой форме). Для проверки возможности белкового транс-сплайсинга в пластидах хлоропласты табака трансформировали плазмидой p226ag. В полученных транспластомных растениях был обнаружен эффективный синтез чужеродных белков и образование химерного белка с одновременным выщеплением фрагментов интеина (рис. 19.17, *б*).

Дальнейшие исследования показали, что транс-сплайсинг белковых фрагментов может происходить в растениях и в том случае, когда ген одного из фрагментов находится в хлоропластах, а другого — в ядре. В качестве модели использовали 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтетазу (EPSPS) *S. typhimurium*, обеспечивающую устойчивость к действию гербицида N-фосфонометил-глицина (глифосфата). Ген N-концевой части EPSPS, слитой с In DnaE (EPSPSn–In), встроили в ядерный геном и отобрали трансгенные растения табака, в хлоропласты которых затем ввели ген химеры Ic–EPSPSc. В двойных трансформантах, выделенных на среде с антибиотиками спектиномицином и канамицином, химера EPSPSn–In транспортировалась в хлоропласты, где в результате транс-сплайсинга с Ic–EPSPSc образовывались функциональные молекулы EPSPS, обеспечивающие устойчивость растений к глифосфату. Выполненная работа открыла возможность осуществления комбинаторной белковой инженерии *in vivo* в трансгенных растениях.

19.10. УДАЛЕНИЕ МАРКЕРНЫХ ГЕНОВ ИЗ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ

В ряде случаев возникает необходимость удаления маркерного гена, по которому осуществлялась селекция трансгенных растений, из генома полученных клонов. Это важно при последовательном введении в растение разных чужеродных генов и связано с тем, что число эффективных селективных маркеров ограничено. Кроме того, это может требоваться при масштабном выращивании трансгенных растений для предотвращения распространения генов устойчивости к антибиотикам в окружающей среде.

В ряде исследований продемонстрирована эффективность системы сайтспецифической рекомбинации *cre*/*lox* фага P1 (см. 18.3.2) для удаления маркерных генов. Например, С. Корнейл с соавторами (2001 г.) интегрировали в пластиды табака ген *aad*A, фланкированный участками *lox*P. Для исключения *aad*A из пластомы в ядро клеток вводили ген *cre* агробактериальной трансформацией или скрещиванием транспластомных растений с независимо полученными трансгенными растениями, продуцирующими Cre. В полученных двойных трансформантах происходило эффективное исключение гена *aad*A из пластомы. Ядерный ген *cre* затем сегрегационно элиминировался в последующих поколениях растений, получаемых из семян. Таким образом можно получать трансгенные или транспластомные растения, содержащие только целевые трансгены без балластных генов селективных маркеров.

19.11. ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ С НОВЫМИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

Огромный прогресс в создании трансгенных растений позволяет все с большей определенностью конструировать растения с новыми свойствами, которые нельзя получить методами классической селекции. В растения можно вводить индивидуальные гены других неродственных растений, животных, бактерий, вирусов. Полученные трансгенные растения можно затем скрещивать между собой и получать варианты с двумя и более чужеродными генами. Это позволяет решать широкий круг проблем, обеспечивая большую экономическую выгоду.

Устойчивость к гербицидам. Генетически измененные растения, обладающие устойчивостью к различным классам гербицидов, в настоящее время являются наиболее успешным биотехнологическим продуктом. Классическая сельскохозяйственная химия стремилась к соз-

данию гербицидов селективного типа, которые угнетали бы рост возможно большего числа видов сорняков, не подавляя при этом развитие культурных растений. В 1960–1970-х гг. был достигнут очевидный прогресс в создании эффективных гербицидов (сульфонилмочевина, имидазолиноны и др.), которые используются в низких концентрациях, малотоксичны для животных и человека и весьма селективны. Однако с тех пор принципиально новых химических препаратов не появилось.

Генетическая инженерия позволила совершить качественный скачок, так как дала возможность генетически изменять устойчивость растений к тем или иным гербицидам. К настоящему времени клонированы гены, кодирующие нечувствительные к действию гербицидов ферменты-мишени, что привело к созданию трансгенных растений, устойчивых к таким препаратам, как глифосфат (коммерческое название Roundup), хлорсульфуроновые и имидазолиноновые гербициды. Изолированы также гены, которые кодируют ферменты деградации некоторых гербицидов, что позволило получить трансгенные растения, устойчивые к фосфинотрицину (коммерческое название BASTA), 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоте (2,4 D), далапону. Например, устойчивая к Roundup трансгенная соя, распространяемая компанией «Asgrow», была в 1997 г. признана в США сельскохозяйственным продуктом года.

Устойчивость к насекомым. Инсектицидные растения были созданы введением в них гена дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* (Bt). Белок Bt высокотоксичен для насекомых, но безопасен для других видов животных и человека. Он является протоксином, который протеолитически расщепляется в кишечнике личинок насекомых, образуя активированный токсин. Активированный токсин специфично связывается с рецепторами в средней кишке насекомых, что приводит к лизису клеток кишечного эпителия. Взаимодействие токсина с рецепторами насекомого строго специфично. В природе найдено большое количество штаммов *B. thuringiensis*, чьи токсины действуют только на определенные виды насекомых.

Препараты бактерий *B. thuringiensis*, содержащие белок Bt, с успехом применяли в сельском хозяйстве для контроля численности вредных насекомых на полях. Однако использование таких препаратов относительно дорого и требует знания биологии насекомых. Поэтому большие усилия были направлены на создание трансгенных растений, эндогенно продуцирующих бактериальный белок Bt.

Оказалось, что введением гена этого белка в геном растений можно получить трансгенные растения, не поедаемые насекомыми. В то же время практическое применение данных методов для создания растений, устойчивых к конкретным насекомым-вредителям, потребовало большой работы по подбору необходимых штаммов *B. thuringiensis* и созданию генно-инженерных конструкций, которые дают наибольший эффект для конкретных групп насекомых. Так, встраивая прокариотические гены дельта-токсинов в геном растений даже под контроль сильных промоторов растений, не удалось получить высокого уровня экспрессии целевых белков, хотя их действие на насекомых было видоспецифичным. Эту проблему решили путем создания модифицированных генов, в которых осуществили перекодировку, используя кодоны, наиболее часто встречаемые в эффективно экспрессируемых генах растений. Таким путем, например, был получен картофель, устойчивый к колорадскому жуку. В настоящее время так называемые Bt-растения хлопка и кукурузы занимают основную долю в общем объеме генетически модифицированных растений этих культур, которые выращивают на полях США.

Устойчивость к вирусам. Вирусы растений наносят большой урон урожайности различных сельскохозяйственных культур, поэтому постоянно ведется работа по селекции растений, устойчивых к тем или иным вирусам. С помощью технологии создания трансгенных растений П. Поуэлл с соавторами в 1986 г. реализовали новый подход. Они получили растения табака, экспрессирующие белок оболочки вируса табачной мозаики. В таких трансгенных растениях инфекционный процесс, вызванный данным вирусом, существенно замедляется. Впоследствии аналогичные результаты были получены для многих других вирусов растений. Оказалось, что трансгенные растения, содержащие кодирующие последовательности поверхностных вирусных белков, приобретают устойчивость к инфекции соответствующим вирусом. Точный механизм возникающей устойчивости к вирусам не установлен, но полагают, что синтезированный эндогенно вирусный белок оболочки блокирует механизм раздевания вируса либо, взаимодействуя с вирусной РНК, ингибирует ее трансляцию и/или взаимодействие с некими структурами растительной клетки.

Устойчивость к неблагоприятным природным факторам. Растения часто подверга-

ются различным неблагоприятным воздействиям окружающей среды, таким как засуха, засоленность почвы, высокая и низкая температура. Некоторые из них эволюционно адаптированы к тем или иным стрессовым воздействиям. Изучая механизмы приспособления определенных растений к таким факторам, можно выявить гены, продукты которых играют ключевую роль в формировании устойчивости. Перенося такие гены методами генетической инженерии в другие растения, можно создавать новые высокоустойчивые к стрессовым воздействиям варианты важных сельскохозяйственных культур.

Например, засоленность является одним из главных факторов, ограничивающих географическое распространение растений, и обусловливает значительное снижение их урожайности. Один из общих механизмов метаболической адаптации к солевому стрессу у растений — накопление осмопротектантов, каким является, например, биполярное соединение аммония глицинбетаин. Исследования показали, что некоторые растения, в частности табак и томаты, не накапливают глицинбетаин и поэтому высокочувствительны к солевому шоку. В биосинтезе глицинбетаина участвуют ферменты холинмонооксидаза (ХМО) и бетаинальдегиддегидрогеназа (БАД). Х. Хаяши с соавторами (1997 г.) показали, что введение гена ХМО в *Arabidopsis* вызывает увеличение устойчивости к солевому и холодовому стрессу. Аналогичный результат получили А. Сакамото с соавторами (1998 г.) при создании трансгенного риса. Г. Джиа с соавторами в 2002 г. получили трасгенные томаты, экспрессирующие БАД лебеды *Atriplex hortensis* и проявляющие достаточно высокую устойчивость к солевому стрессу.

Биосинтез жиров. Важнейшим сырьем для получения ряда химических веществ являются жирные кислоты — основной компонент растительного масла. Эти соединения обладают различными физико-химическими свойствами в зависимости от степени насыщенности и длины углеродной цепи. Задача исследователей состоит в том, чтобы изменить соотношение жирных кислот в семенах масличных культур с целью достичь максимального выхода необходимого компонента. Например, в 1994 г. была закончена экспериментальная проверка и получено разрешение от федеральных властей США на выращивание и коммерческое использование трансгенных растений рапса с измененным составом растительного масла, в котором вместе с обычными 16- и 18-членными жирными кислотами содержится также до 45 % 12-членной жирной кислоты — лауриновой. Это вещество широко используется для производства стиральных порошков, шампуней, косметики.

Экспериментально эта задача была решена следующим образом. Был клонирован ген специфической тиоэстеразы из лавра калифорнийского *Umbellularia californica*, где содержание лаурата в жире семян достигает 70 %. Структурную часть гена этого фермента под контролем промотора и терминатора гена белка, специфичного для ранней стадии образования семян, встроили в геном рапса, что и привело к увеличению содержания лаурата в масле этих растений.

Дальнейшее изучение специфики биосинтеза жирных кислот, по-видимому, приведет к возможности управлять этим процессом в целях получения жирных кислот различной длины и степени насыщенности, что позволит значительно изменить производство кондитерских изделий, лекарств, косметики, детергентов, затвердителей, полимеров, смазочных материалов, дизельного топлива и многого другого, что связано с использованием углеводородного сырья.

Необычные свойства трансгенных растений. Большое внимание уделяется исследованиям, направленным на создание растений с улучшенными питательными качествами. Злаковые и бобовые представляют собой важный источник белка для человека и домашних животных. В зерне злаков белок составляет 10–15 % от общей массы, а в бобовых — 20–30 %. При этом 50–60 % белков являются запасными. Основные запасные белки у бобовых представлены солерастворимыми глобулинами, в то время как у злаковых — спирторастворимыми проламинами. В проламинах злаков обычно отсутствует лизин, а в глобулинах бобовых снижено содержание метионина и цистеина. Обеспечить сбалансированность питания по указанным аминокислотам можно с помощью трансгенных растений, в запасающих органах которых синтезируются белки, обогащенные метионином и лизином.

В шлифованном рисе, являющемся основным источником пищи в ряде тропических стран с многочисленным населением, отсутствует провитамин А (β-каротин). Это приводит к дефициту витамина А и способствует развитию различных заболеваний, особенно у детей. К. Йе с соавторами (2000 г.) предприняли попытку создать трансгенные растения риса *Oryza sativa* с улучшенными питательными свойствами за счет включения провитамина А в состав зерна. Были получены трансгенные растения риса, содержащие раздельно введенные гены,

кодирующие три фермента биосинтетического пути β-каротина. Зерна такого риса накапливали в эндосперме провитамин А в достаточном количестве и были окрашены в золотистый цвет.

Получены и испытываются трансгенные растения хлопка с окрашенным волокном. Предполагается, что в будущем натуральное хлопковое волокно станет крепче, не будет ни мяться, ни садиться и будет иметь различную окраску без использования химических красителей.

Интересной областью применения методов генетической инженерии является создание трансгенных растений с измененными декоративными свойствами, такими как необычная окраска цветов и т. п.

Недавно созданы трансгенные растения табака, в листьях которых содержание никотина в десятки раз ниже по сравнению с исходными растениями. Полагают, что курение сигарет из такого табака будет менее вредным для здоровья.

Необходимо отметить, что рынок для продуктов с новыми качествами более значителен, чем рынок для продуктов с улучшенными чисто сельскохозяйственными признаками, хотя именно такие признаки, как устойчивость к гербицидам и насекомым, получили первый коммерческий успех.

19.12. ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ

Растения, животные и микроорганизмы, модифицированные генно-инженерными методами, принято называть генетически измененными, а продукты их переработки для пищевых потребностей — трансгенными пищевыми продуктами или ***генетически модифицированными источниками пищи*** (ГМИ).

Первый ГМИ — устойчивый при хранении томат сорта Flavr Savr («Calgene Inc.», США) — появился на продовольственном рынке США в 1994 г. после многолетних предварительных испытаний. В настоящее время спектр используемых ГМИ значительно расширился. Благодаря новым полезным свойствам трансгенные растения, как используемые в пищу, так и технические сельскохозяйственные культуры, становятся более технологичными и дешевыми и постепенно вытесняют сорта, полученные методами классической селекции. Площади возделывания трансгенных культур в мире растут с каждым годом (рис. 19.18). Однако во многих странах до сих пор идут жаркие споры о потенциальной опасности ГМИ. Несомненно, прежде чем попасть на прилавки магазинов, они должны проходить длительную процедуру всестороннего изучения возможных побочных эффектов на организм человека и животных. Должна исключаться возможность распространения трансгенов в окружающей среде. Однако в целом следует сказать, что опасения противников ГМИ не имеют каких-либо реальных подтверждений. У человечества нет альтернативы использованию новейших технологий получения ГМИ, так как классические подходы к созданию высокопродуктивных сортов себя во многом исчерпали, территории, пригодные для землепользования, практически освоены, а дефицит продуктов питания в целом на земном шаре будет с годами нарастать. И именно генетическая инженерия способна радикально решить встающие перед человечеством проблемы.

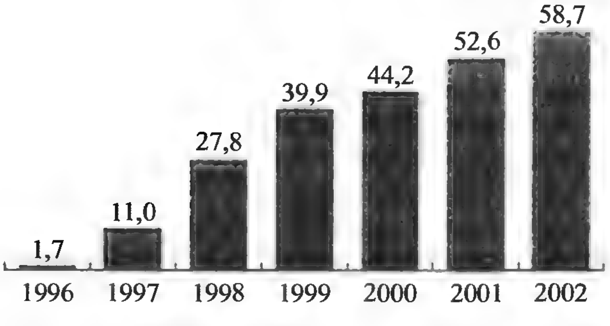


Рис. 19.18. Динамика увеличения общей площади возделывания трансгенных растительных культур в мире (млн га)

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Борлоуг Н. Э. «Зеленая революция»: вчера, сегодня и завтра // Экология и жизнь. 2001. Т. 21, №. 4. С. 16–23.

Глеба Ю. Ю. Биотехнология растений // Соросовский образовательный журн. 1998. № 6. С. 3–8.

Лихтенштейн К., Дрейпер Дж. Генетическая инженерия растений // Клонирование ДНК. Методы / Под ред. Д. Гловера. М.: Мир, 1988. С. 315–380.

Лутова Л. А. Генетическая инженерия растений: свершения и надежды // Соросовский образовательный журн. 2000. № 10. С. 10–17.

Рекославская Н. И., Саляев Р. К., Щелкунов С. Н. «Съедобные» вакцины на основе трасгенных растений // Изучение генома и генетическая трансформация растений. Новосибирск: Наука, 2001. С. 193–210.

Abel P. P., Nelson R. S., De B. et al. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene // Science. 1986. Vol. 232. P. 738–743.

Arakawa T., Chong D. K. X., Langridge H. R. Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine // Nat. Biotechnol. 1998. V. 16. P. 292–297.

Arakawa T., Yu J., Chong D. K. et al. A plant-based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes // Ibid. P. 934–938.

Chen H. Recent advances in mucosal vaccine development // J. Control. Release. 2000. Vol. 67. P. 117–128.

Chilton M.-D., Drummond M. H., Merlo D. J. et al. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis // Cell. 1977. Vol. 11. P. 263–271.

Chin H. G., Kim G.-D., Marin I. et al. Protein trans-splicing in transgenic plant chloroplast: Reconstruction of herbicide resistance from split genes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2003. Vol. 100. P. 4510–4515.

Daniell H., Lee S.-B., Panchal T., Wiebe P. O. Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts // J. Mol. Biol. 2001. Vol. 311. P. 1001–1009.

Daniell H., Streatfield S. J., Wycoff K. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants // Trends. Plant. Sci. 2001. Vol. 6. P. 219–226.

De Cosa B., Moar W., Lee S.-B. et al. Overexpression of the *Bt cry*2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals // Nat. Biotechnol. 2001.Vol. 19. P. 71–74.

De Frammond A. J., Barton K. A., Chilton M.-D. Mini-Ti-: a new vector strategy for plant genetic engineering // BioTechnology. 1983. Vol. 5. P. 262–269.

Gelvin S. B. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the «Gene-Jockeying» tool // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003. Vol. 67. P. 16–37.

Haq T. A., Mason H. S., Clements J. D., Arntzen C. J. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants // Science. 1995. Vol. 268. P. 714–719.

Hamilton C. M., Frary A., Lewis C., Tanksley S. D. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. P. 9975–9979.

Hayashi H., Alia, Mustardy L. et al. Transformation of *Arabidopsis* with the *cod*A gene for choline oxidase: accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress // Plant. J. 1997. Vol. 12. P. 133–142.

Heifetz P. B., Tuttle A. M. Protein expression in plastids // Curr. Opin. Plant. Biol. 2001. Vol. 4. P. 157–161.

Hiatt A., Cafferkey R., Bowdish K. Production of antibodies in transgenic plants // Nature. 1989. Vol. 342. P. 76–78.

Hoecema A. P., Hirsh P. R., Hooykaas P. J. J., Schilperoort R. A. A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid // Nature. 1983. Vol. 303. P. 179–180.

Hou B. K., Zhou Y.-H., Wan L.-H. et al. Chloroplast transformation in oilseed rape // Transgenic Res. 2003. Vol. 12. P. 111-114.

Huang F.-C., Klaus S. M. J., Herz S. et al. Efficient plastid transformation in tobacco using the *aph*A-6 gene and kanamycin selection // Mol. Genet. Genomics. 2002. Vol. 268. P. 19–27.

Jia G.-X., Zhu Z.-Q., Chang F.-Q., Li Y.-X. Transformation of tomato with the *BADH* gene from *Atriplex* improves salt tolerance // Plant Cell Rep. 2002. Vol. 21. P. 141–146.

Kapusta J., Modelska A., Figlerovicz M. et al. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus // FASEB J. 1999. Vol. 13. P. 1796–1799.

Kong Q., Richter L., Yang Y. F. et al. Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2001. Vol. 98. P. 11539–11544.

Lauterslager T. G. M., Florack D. E. A., van der Wal T. J. et al. Oral immunization of naive and primed animals with transgenic potato tubers expressing LT-B // Vaccine. 2001. Vol. 19. P. 2749–2755.

Ma J. K.-C., Wycoff K., Vine N. D. et al. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans // Nat. Medicine. 1998. Vol. 4. P. 601–606.

Maliga P. Progress towards commercialization of plastid transformation technology // Trends Biotechnol. 2003. Vol. 21. P. 20–28.

Martin-Alonso J. M., Castañon S., Alonso P. et al. Oral immunization using tuber extracts from transgenic potato plants expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein // Transgenic Res. 2003. Vol. 12. P. 127–130.

Mason H. S., Ball J. M., Shi J.-J. et al. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. P. 5335–5340.

Mason H. S., Haq T. A., Clements J. D., Arntzen C. J. Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene // Vaccine. 1998. Vol. 16. P. 1336–1343.

Mason H. S., Lam D. M. K., Arntzen C. J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1992. Vol. 89. P. 11745–11749.

Mason H. S., Tacket C. O., Richter L. J., Arntzen C. J. Subunit vaccines produced and delivered in transgenic plants as «edible vaccines» // Res. Immunol. 1998. Vol. 149. P. 71–74.

Miranda A., Janssen G., Hodges L. et al. *Agrobacterium tumefaciens* transfers extremely long T-DNAs by a unidirectional mechanism // J. Bacteriol. 1992. Vol. 174. P. 2288–2297.

Modelska A., Dietzschold B., Sleysh N. et al. Immunization against rabies with plant-derived antigen // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1998. Vol. 95. P. 2481–2485.

Mohan Babu R., Sajeena A., Seetharaman K., Reddy M. S. Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management — an over view // Crop Protection. 2003. Vol. 22. P. 1071–1086.

Peeters K., Wilde C. D., Jaeger G. D. et al. Production of antibodies and antibody fragments in plant // Vaccine. 2001. Vol. 19. P. 2756–2761.

Porta C., Lomonossoff G. P. Scope for using plant viruses to present epitopes from animal pathogens // Rev. Med. Virol. 1998. Vol. 8. P. 25–41.

Ruf S., Hermann M., Berger I. J. et al. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit // Nat. Biotechnol. 2001. Vol. 19. P. 870–875.

Sakamoto A., Alia, Murata N. Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold // Plant. Mol. Biol. 1998. Vol. 38. P. 1011–1019.

Staub J. M., Garcia B., Graves J. et al. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts // Nat. Biotechnol. 2000. Vol. 18. P. 333–338.

Streatfield S. J., Jilka J. M., Hood E. E. et al. Plant-based vaccines: unique advantages // Vaccine. 2001. Vol. 19. P. 2742–2748.

Svab Z., Maliga P. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aad*A gene // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1993. Vol. 90. P. 913–917.

Svab Z., Hajdukiewicz P., Maliga P. Stable transformation of plastids in higher plants // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1990. Vol. 87. P. 8526–8530.

Tacket C. O., Mason H. S., Losonsky G. et al. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato // Nat. Med. 1998. Vol. 4. P. 607–609.

Taylor K. M., Lin T., Porta C. et al. Influence of three-dimensional structure on the immunogenicity of peptide expressed on the surface of a plant virus // J. Mol. Recognit. 2000. Vol. 13. P. 71–82.

Thanavala Y., Yang Y.-F., Lyons P. et al. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1995. Vol. 92. P. 3358–3361.

Töpfer R., Martini N., Schell J. Modification of plant lipid synthesis // Science. 1995. Vol. 268. P. 681–686.

Vidya S. C. S., Manoharan M., Kumar R. C. T. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* var. Pusa Ruby) with coat-protein gene of *Physalis* Mottle Tymovirus // J. Plant Physiol. 2000. Vol. 156. P. 106–110.

Warzecha H., Mason H. S., Lane C. et al. Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato // J. Virol. 2003. Vol. 77. P. 8702–8711.

Wigdorovitz A., Filgueira D. M. P., Robertson N. et al. Protection of mice against challenge with foot and mouth disease virus (FMDV) by immunization with foliar extracts from plants infected with recombinant tobacco mosaic virus expressing the FMDV structural protein VP1 // Virology. 1999. Vol. 264. P. 85–91.

Ye X., Al-Babili S., Klöti A. et al. Engineering the provitamin A (β-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm // Science. 2000. Vol. 287. P. 303–305.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Азотистые основания 11
Алкогольдегидрогеназа 311
α-Амилаза 250–251
Аминокислоты, обозначение 122
Аминоптерин 340
Амплификация ДНК
— — *in vitro* 48
— — *in vivo* 258–260, 296, 343–348
Антиген 200, 433
Антигенная детерминанта 197, 434
Антитело 197, 200, 433, 470
— моноклональное 198, 468

Бакмида 107–109, 427
Бактериофаг *см.* Фаг
Бесклеточное молекулярное клонирование 49
Белки
  амино-конец (N-конец) 12
  биосинтез 148–150, 315
  гликозилирование 318–320, 421, 470–471
  карбокси-конец (C-конец) 12
  очистка 123, 126
  секреция 130–131, 250–257, 318–322, 421, 469
  стабильность *in vivo* 124, 153–154, 315–318
  суперпродукция 148–152
— химерные 9, 101, 122, 126, 191–195, 318
  последовательность 6×His 126
  специфичное расщепление 161–162
Белковая инженерия 187
Белковое праймирование 374
Белковый сплайсинг 483–485
Библиотека генов 102, 105, 308, 346
— антител фаговая 200–202
— пептидная (эпитопная) фаговая 198–199
Блоттинг
  по Саузерну 56
  Нозерн 56
  Вестерн 56

Вакцинация 222, 432
Вакцины
  аттенуированные 434, 444–445
  живые 381, 387–388, 395–398, 434, 445–446
  инактивированные 434, 445
  молекулярные 435
  мукозные 472
  пептидные 435
  поливалентные 222, 437
  субъединичные 434, 444
  съедобные 472–475
    ДНК-вакцины 438–439, 446
Векторная молекула *см.* Молекулярный вектор

β-Галактозидаза 101, 112, 113, 124
  α-акцептор 113
    выделение 123
    выявление активности 101, 392, 418, 431
  α-донор 113
  α-комплементация 113
Ген
  3′-конец 12, 316
  5′-конец 12
— суицидный 382
— *ams* 153
— *cea* 86
— *kil* 86, 136
— *lacZ* 100, 112
— *lacI* 113
— *lon* 153
— *pin* 154
— *rop* 87
— *trpE* 125
Ген-эквивалент 163
Генетицин (G-418) 300, 308, 349, 426
Генетический код 122
Генная пушка 293, 467
— терапия 382–384, 409–412
Геномный проект 45–48
Гибридизация нуклеиновых кислот *in situ* 34–35, 85, 124
Гибридные антибиотики 278–279
Гибридные (рекомбинантные) ДНК 9
  методы конструирования 28–30
    коннекторный 28–29
    рекомбинация *in vivo* 328–329, 386–387, 392–394
    рестриктазно-лигазный 29–30
  нестабильность *in vivo* 108, 204–210, 220, 301–305, 338–339
Гликозилирование 318–320, 332, 421, 470–471
Глушитель транскрипции 338, 357, 364

Дигидрофолатредуктаза 300, 343–344
Дифференциальная окраска бактерий по Граму 80
ДНК 10
  денатурация 11
  палиндром 16
  расшифровка последовательности *см.* Секвенирование
  ренатурация (отжиг) 12
  суперскрученность 148
  фрагменты 14–15
    липкий конец 17
    тупой конец 17
— комплементарная (кДНК) 161

ДНК-гираза 148
ДНК-лигаза 22–23
продукты реакции 31
ДНК-метилаза 14
ДНК-полимераза I *E. coli* 23–25, 48
метод репарации, направляемой праймером 25
реакция ник-трансляции 24–25
фрагмент Кленова 25
ДНК-топоизомераза 148
Доза гена 139, 141
Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* 286–288
автономно реплицирующиеся последовательности (*ARS*) 299–301
аск 287
генетическая номенклатура 288
двухгибридная система 326–329
молекулярные векторы
YAC-система 307–308
— — интегративные 294–298
— — линейные 307–308
на основе цитоплазматических киллерных плазмид 309–310
— — репликаторные 299
— — центромеросодержащие 303
— — эписомные 298
плазмида 2 мкм (Scp1) 289–292
— 3 мкм 292
плазмидная трансформация 292–293
теломера 305–307
тетрадный анализ 287
тип спаривания 287
феромон 287
центромера 302–303

Замолкание (сайленсинг) гена 467

Иммуноблоттинг 57–58
Иммуноглобулин 200, 433, 468–469, 471
фрагмент Fab 200
— Fc 200
Иммунность к колицину 86–88
Иммунотоксин 195–196
Индукция транскрипции 113, 146
Интеин 484
Искусственная хромосома
бактериальная 107–109
дрожжей 305–308

Клеточная стенка *Bacillus subtilis* 234
— — *Escherichia coli* 80–83
Клон 31, 34, 101
Клонирование 31
Клонотека генов 218
Коамплификация 258, 344, 347–348
Кодон 122, 150, 165, 280, 315
Компетентность клетки индуцированная 32, 83–84
— — физиологическая 32, 235
Колицин 86–87
Комплементация мутаций 158, 243
— — функциональная 35, 158–159
Концевая дезоксинуклеотидилтрансфераза 27
Конъюгация 213, 219, 276
Космида 105–108, 218
Котрансформация 296, 342–343
Ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза 340, 349, 392–393

β-Лактамаза 89
Лактозный оперон 112–113
индукция 113
индуктор ИПТГ 113
репрессия 112–113
суперпродукция репрессора 113
Левансахараза 256
Летальный зигозис 276
Лизогенизация 97, 207
Лимфоцит 433
Линия клеток млекопитающих
— — — ВНК-21 338
— — — COS 348, 361–362
— — — CV1 338, 354, 361
— — — L TK$^-$ 341
— — — 293 375
— — — 293Cre 379
— — — 3T3 403
— — — Ψ2 405
— — насекомых 416
Линкерные молекулы (линкеры) 30, 251–252
Липкий конец 17
Локус *par* 108, 205
Люцифераза 393

Методы введения молекул ДНК в клетки млекопитающих
гипертонический солевой 332–333
ДЭАЭ-декстрановый 333, 336
кальций-фосфатный 333–334, 336
катионные липидные реагенты 335
липосомный 334–335, 336
микроинъекция 334, 336
прокалывание 336
прямой перенос плазмид из бактерий 337
реконструированные *in vitro* вирусоподобные частицы 337
электропорация 337
Метотрексат 340, 343
Микофеноловая кислота 348
Микрочип олигонуклеотидный 54–55
Молекулярный вектор выпотрошенный 379
— — интегративный 32, 257–260, 294–298, 347
— — клонирующий 31, 85, 217–219, 240–244, 272, 298–305
— — нацеленный 383–384, 453
— — обеспечивающий прямую селекцию 118–121, 243–245, 250
— — секреции 130, 250–255
— — челночный 229–232, 239, 249–250, 281, 365
— — экспрессирующий 31, 121–129, 220–221, 223
Молекулярные векторы на основе
аденовирусов человека 375–380
бакуловирусов 417–428
вируса мозаики коровьего гороха 478–479
вируса осповакцины 392–393
вируса папилломы быка (BPV-1) 367–371

вируса простого герпеса (HSV-1) 386–387
HSV ампликон 388–389
вируса табачной мозаики 475–478
вируса Эпштейна–Барр 389–390
вируса SV40 358–365
литические 358–363
нелитические 363–364
трансформирующие 364–365
эписомные 348–349
ретровирусов 402–408, 412
самоинактивирующиеся векторы 412
РНК-вирусов 437
транспозонов эукариот 429–431
Молекулярная мимикрия вирусов 373
Мутагенез сайтспецифический 171, 180–185, 187–190
— сегмент-направленный 171, 175–180, 200
— статистический 114, 173–175
Мутационное клонирование 278

Ник-трансляция 24–25
Нокаутные животные 453–454
Нуклеаза Bal31 27
— S1 27
Нуклеозид 10
Нуклеотид 10–11

Обратная генетика 171, 286
— транскриптаза (ревертаза) 25–26
Ограничение (рестрикция), контролируемое хозяином 13, 100
Оперон лактозный *см.* Лактозный оперон
— триптофановый 220, 243
— *tra* 213

Палиндром 16
Партисома 205
Пептидогликан 80–82, 234
Первичные метаболиты 167
Периплазматическое пространство 81, 83, 130, 131, 134, 200
Пермиссивные клетки 32
Пили 110, 213
Плазматическая мембрана 80–81
Плазмида 85, 211
коинтегранты 213
конъюгативность 213
мобилизация 213, 219, 239
мультимерные формы 209–210
несовместимость 214
нестабильность поддержания *in vivo* 204–210, 267–269, 301–302
сегрегационная 204–209
структурная 204, 207, 209
— криптическая 213, 289
— резидентная 237
— с ослабленным контролем репликации 85
— со способностью к безудержной репликации 93
— со строгим контролем репликации 85
— трансмиссивная 213
— челночная между бактериями разных семейств
pAM401 272, 273
pAT127 272
pAT187 239
pCH1 230
pCK1 272
pDP1 229
pEB003 281–282
pHY416 280
pKJB200 250
pMK3 249–250
pMK4 249–250
pPL1940 231
pQB79-1 250
pVA856 272
pHV12 249
pHV14 249, 265
pHV33 264
— широкого спектра бактериальных хозяев
группы IncP 215, 225–228
группы IncQ 215, 216–224
pAF300 225
pAMβ1 239
pERD20 221
pGSS15 219
pGSS33 219
pIRL2 219
pKT210 217
pKT231 223
pKT240 219–220
pKT247 217
pLAFR-5 219
pMMB6 220
pMMB22 220
pMMB33 218
pMMB34 218
pMMB66EH 220–221
pNP109 223
pNP148 223
pPLGN1 221, 223
pRK290 225–226
pRK310 225, 227
RK2 215, 225–227
RSF1010 215–217
— *Bacillus subtilis*
мультимерная 237 238, 289
резидентная 237
pBD8 244
pBD9 244
pBD10 244, 282
pBD12 244
pBD64 244
pBD214 242, 244
pFH7 261
pHV11 242
pKTH51 251–253
pKTH114 251–252
pOC1 245
pPL10 240
pPL603 242, 245, 266, 267
pSA2100 243
ΔpSM19035 246
pTB90 248
pTL10 247–248
pTL12 248

Плазмида
— *Escherichia coli*
ColE1 86–88
pAA31 121
pAA31P 121
pACYC184 273
pAS 127–128
pAS1-3 133–134
pBAC108L 108–109
pBBV 95–96
pBluescript II 118
pBR313 89
pBR322 89–91
pBR325 91, 92
pBR327 91–92
pBR328 92–93
pDOC55 129–130
pEAP8 136
pEMB101 128–129
pHSG422 86
pIN-III-ompA 132–133
pJB8 107
pKC16 140–141
pKN80 119
pKN402 93–94, 140
pKN410 93–94
pKY2800 121
pLG338 86
pMB8 88
pMB9 88–89, 136
pMB123 96
pMB124 96
pMOB45 94
pMOB48 94
pOU 140
pPC-*ф* 123
pQE-30 126–127
pRIT11 133, 135
pRSF2124 88–89
pSC101 85–86
pSCC31 121
pTR262 121
pUC7 119, 120
pUC8 120
pUC9 120
pUK270 124–125
pUR1 119
pUR250 119
pUR290 123–124
— *Staphylococcus aureus*
pC194 240–242
pE194 240, 242
pT181 240–242
pUB110 240–242
— *Streptococcus*
pAM77 272
pAM510 272
pDB101 272
pDB201 272
pGB301 272
pIL252 272, 274
pLS1 272, 274
pMV158 272
pSM10221 272
pVA1 272
pVA749 272
— *Streptomyces*
pIJ101 277
pIJ350 277
pIJ702 277
pIJ922 276, 278
pSG5 278
SCP2 276
SCP2* 276
Пластома 479
Поли(А)-полимераза *E. coli* 28
Полимераза *Taq* 48
Полимеразная цепная реакция 48–50
мультиплексная 50
протяженная 50
Полиэдрин 415–416
Праймер 23
«Прогулка по хромосоме» 103–104, 108
Промотор 122, 128–129, 143, 145–146, 263, 316, 354, 392, 416
сайт активации 310
эффективность (сила) 143, 147
— гибридный 144, 220
— регулируемый 146
— широкого круга хозяев 216
— эукариот 157
— *Bacillus subtilis* 263
— *Escherichia coli* 122, 128–129
— *Streptomyces* 279
Протеаза 153, 154, 162
Протопласт 33, 238–239, 275
Профаг 97, 260
Псевдотипирование ретровируса 402
Пульс-электрофорез 58, 109

Радиоиммуноанализ белков *in situ* 35–36, 124
Рекомбиназа Cre 108, 454
Рекомбинантные ДНК *см.* Гибридные ДНК
Рестриктаза (эндонуклеаза рестрикции) 14
изошизомер истинный 19
— ложный 19
номенклатура 14–15
прототип 19
распространенность 21–22
участок (сайт) узнавания 15–19
— класса I 15–16
— класса II 16–19
— класса III 16, 21
— подкласса IIS 16, 20–22
Репликатор 86–87
Репликон 211, 301
Репрессия транскрипции 113, 126, 128
Рибосома 149, 263
мРНК
полиаденилирование 313, 365, 391
стабильность 148, 152–153
участок связывания рибосом 149, 157
— моноцистронные 150
— полицистронные 150

РНК-полимераза
— фага T7 147, 223
— *Bacillus subtilis* 262–263
σ-факторы 263
— *Escherichia coli* 142
кор-фермент 142
σ-факторы 142, 143
холофермент 142

Сайленсинг 467
Селективный маркер 34, 85, 216, 349, 392, 464
— — доминантный 343, 349, 394–395
Секвенирование ДНК 36
метод Максама–Гилберта 38–42
метод Сэнгера 38, 39, 42
«плюс-минус»-метод 36–38
Секреция белка 130, 131, 135, 250–257, 318–322, 421, 469
Сигнальная пептидаза 130
Сигнальный пептид 130–131
Система рестрикции–модификации (R–M) 14, 16, 20–22, 99–100
Скрининг клонов 34
Спасение маркера 386, 392
Сплайсинг белковый 483–485
— РНК 313–314, 332, 365, 392, 402
— — альтернативный 354–355, 372–373, 410
Стволовые клетки 409–410, 450
Супрессия нонсенс-кодонов 165
Сферопласт 33, 83

Тейхоевые кислоты 234
Тельца включения 154, 283
Теломера 305–308
Терминатор транскрипции 143, 147, 313
— — ρ-зависимый 86, 143–145
— — ρ-независимый 143–145
Тимидинкиназа 160, 300, 340–341, 386
Токсин дифтерийный 195
— кишечной палочки 472–474
— коклюшный 267
— стафилококковый 266
— стрептококковый 266
— холерный 474–475
Трансген 339, 448
Трансгенные животные 448–458
нокаутные 453–454
— растения 460–468
Транспластомные растения 479–483
Транскрипция 158
инициация 12, 158, 326–327, 416
терминация 158, 313
— индуцируемая 113, 220, 223–224, 256, 315, 349–352, 456
— конститутивная 113, 220
Трансляция 148
метод оптимизации 150–152
Трансфектант 32
Трансфекция 32, 239–240, 332–335
Трансформант 32
Трансформация плазмидная 84, 237–239, 292–293
— профаговая 260
— генетическая
— — бактерий 234–237
— — дрожжей 293–297
— — клеток млекопитающих 339–342
Триплет 124, 128, 315
Тупой конец 17

Упаковывающая (комплементирующая) линия клеток 348, 361–362, 375, 404–405
Усилитель транскрипции (энхансер) 357
Устойчивость бактерий к антибиотикам 212–213
Участок *ori* 86–87, 213, 344
— SD 149, 152, 264
— связывания рибосом на мРНК 122, 128, 149, 263–264, 416–417
гибридный 128
последовательность Шайна–Дальгарно (SD-участок) 149, 152

Фаг
бляшка 13
титрование 13
— ρ11 260
— ϕ3T 260
— ϕ105 261
— SPβ 261
Фаг лямбда 13
вектор внедрения 99, 100
λIV 99
λ598 100
λ607 99
λgt11 101
λ*lac*5-1 99, 100–101
вектор замещения 101
λCh40 102, 104
λDASH 104
λEMBL3 104
λEMBL4 104
λEMBL12 104
λgt-λB 101–103
λgt-λC 101, 102
λ*lac*1–2–3 102
λ567 102
λ678 102
λ781 102
индукция из профага 127, 207
ограничение, контролируемое хозяином 13, 100
репрессор cI 97–98
упаковка ДНК *in vitro* 84–85
cos-сайт 97, 105, 108
Фаг нитевидный
полифаг 196
репликативная форма ДНК 111
M13 110–111
молекулярные векторы
M13mp2 112, 114
M13mp7 115
M13mp8 115
M13mp9 115
M13mp10 182
M13mp14 182
M13mp15 182

Фаг нитевидный
— — M13, молекулярные векторы
M13mp19 182
SSEV19 116
— — f1, векторы
pEMBL8 118
pEMBL9 118
pEMBL18 118
pEMBL19 118
— — fd, векторы
fd101 117
fd103 117
fd106 117
Фаг P1
участок *lox*P 108, 454
рекомбиназа Cre 108, 454
Фагмида 118, 199
Фаговый дисплей 196
биопенинг 198
направленная эволюция белков 200, 202
— — антител 200
Фазмида 109–110
Фактор ρ 145
— σ 142–143, 263
Фенотипическая система селекции 34, 160, 392, 393, 418, 431

Химический синтез ДНК
использование ПЦР для синтеза искусственных генов 75–77
компьютерное планирования синтеза искусственных генов 70–72
метод К. Итакуры 72–73
— Г. Кораны 59–62
— В. Мандеки 74–75
— модульный 67
сборка ДНК на твердой матрице 69–70
Хлорамфениколацетилтрансфераза 91, 300

Центромера 302–303

Частота встречаемости кодонов 62, 280, 315, 317

Экскреция белка из клеток *E. coli* 130–132, 136
Экстеин 484
Электропорация 33, 84, 239, 337
Элонгация 143, 147
Энхансер 357
Энциклопедия генов 104
Эпитоп 198, 434–435
Эффект положения гена 344, 369, 466

Учебное издание

Щелкунов Сергей Николаевич

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Редактор *Г. И. Сергеева*
Технический редактор *В. Н. Морошкин*
Корректор *Л. А. Федотова*
Обработка иллюстраций *П. Р. Пунгин*
Обложка *В. А. Кривобоков*
Компьютерная верстка *Т. В. Соболева*

Изд. лиц. ИД № 000313 от 22.10.99

Гигиенический сертификат № 54.НК.05.953.П.000146.12.02 от 02.11.02

Подписано в печать 26.04.04. Формат 60×84/8. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 67,5. Уч.-изд. л. 55,3. Тираж 2000 экз. Заказ 7306.

Сибирское университетское издательство
630058, Новосибирск, ул. Русская, 39

ФГУИПП «Советская Сибирь»
630048, Новосибирск, ул. Немировича-Данченко, 104

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

165

Учебно-справочное пособие нового типа

Для студентов, аспирантов и преподавателей биологических и химических факультетов вузов, а также специалистов, работающих в области молекулярной биологии, генетики, биохимии, микробиологии и биотехнологии

История развития и современное состояние генетической инженерии

•

Новейшие достижения и методы генетической инженерии вирусов, бактерий, дрожжей, растений и млекопитающих

•

Современные методы создания противовирусных вакцин

•

Успехи и проблемы генной терапии

•

Белковая инженерия – новейшее направление генетической инженерии

•

Трансгенные животные и растения – биотехнология настоящего и будущего

ЩЕЛКУНОВ Сергей Николаевич – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент Российской академии естественных наук, заведующий отделом молекулярной биологии геномов Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор».

С 1980 г. преподает на факультете естественных наук Новосибирского государственного университета. Разработал и читает общий курс лекций «Микробиология» и специальный курс «Генетическая инженерия».

Области основных научных интересов: генетическая инженерия, структурно-функциональная организация и эволюция вирусных геномов, экспрессия генов эукариот и их вирусов в различных генно-инженерных системах.

Автор более 260 научных работ, в том числе трех монографий. Соросовский профессор, член подкомитета по изучению вируса натуральной оспы Всемирной организации здравоохранения и Американского микробиологического общества, входит в редколлегию журнала «Молекулярная биология».

ISBN 5-94087-098-8

9 785940 870982